



Aus der Klinik für Innere Medizin III –  
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm

## **Monozytenfunktion in der trainingsinduzierten Arteriogenese**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von: Dominic Norman Millenaar

geboren am: 02.11.1989 in Troisdorf

„Gehen ist des Menschen beste Medizin“

Hippokrates von Kos (ca. 460 – 370 v. Chr.)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>7</b>
1.1 Makrophagendepletion durch Clodronat-Liposomen inhibiert trainingsinduziertes Kollateralarterienwachstum .....	7
1.2 Macrophage depletion using clodronate liposomes delays exercise-induced collateral artery growth.....	8
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
2.1 Hintergrund.....	10
2.2 Grundlagen des Gefäßwachstums .....	11
2.3 Stimulation der Arteriogenese .....	12
2.4 Rolle von Stickstoffmonoxid.....	14
2.5 Ziele der Arbeit.....	15
<b>3 Material .....</b>	<b>16</b>
3.1 Verbrauchsmaterialien.....	16
3.2 Chemikalien / Reagenzien / Kits .....	16
3.3 Lösungen und Puffer .....	18
3.4 Primer für PCR .....	19
3.5 Antikörper für Immunhistochemie .....	19
3.5.1 Primärantikörper.....	19
3.5.2 Sekundärantikörper .....	20
3.6 Antikörper für FACS .....	20
3.7 Computersoftware .....	20
3.8 Geräte.....	21
<b>4 Methoden .....</b>	<b>23</b>
4.1 Versuchstierbehandlung .....	23
4.1.1 Allgemeines.....	23
4.1.2 Käfighaltung und Ausdauertraining .....	23
4.1.3 Narkosen.....	24
4.1.4 Blutentnahmen .....	25
4.1.5 Injektionen der Clodronat-Liposomen .....	25
4.1.6 Tötung und Organentnahme .....	25
4.2 Monozyten-/Makrophagendepletion mittels Clodronat-Liposomen .....	26

4.2.1	Wirkung der Clodronat-Liposomen .....	26
4.2.2	Etablierung des Clodronat-Injektionsschemas .....	27
4.3	Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	28
4.3.1	Grundlagen der FACS-Analyse .....	28
4.3.2	Messung .....	29
4.4	Femoralarterienligatur .....	29
4.5	Perfusionsmessungen.....	30
4.5.1	Mikrosphärenperfusionsmessungen .....	31
4.5.2	Laser-Doppler-Perfusionsmessungen.....	33
4.6	Microfil-Angiographie.....	35
4.7	Immunhistochemie .....	36
4.7.1	Allgemeines und Probengewinnung.....	36
4.7.2	Anti-F4/80-Färbung .....	36
4.7.3	Anti-iNOS-Färbung.....	37
4.7.4	Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin-Färbung.....	37
4.7.5	Anti-CD31-Färbung .....	38
4.7.6	Auswertung .....	38
4.8	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR-Analyse.....	39
4.8.1	RNA-Isolation aus Vollblut .....	39
4.8.2	RNA-Isolation aus Gewebe.....	40
4.8.3	Erstellung der cDNA.....	40
4.8.4	Amplifikation der cDNA.....	41
4.9	NOSdetect Assay Kit.....	42
4.10	Statistik .....	43
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
5.1	Etablierung und Wirkung der Clodronat-Behandlung.....	44
5.1.1	Clodronat vermindert die Monozytenpopulation im peripheren Blut nach 24 h .	44
5.1.2	Verlauf der Monozytenkonzentration im Blut .....	45
5.1.3	Clodronat verringert die Makrophagendichte in Leber und Milz nach 48 h.....	46
5.1.4	Clodronat reduziert die Anzahl perivaskulärer Makrophagen im M. adductor magnus .....	47
5.1.5	Vergleich verschiedener Injektionsschemata .....	48
5.1.6	Einfluss von Clodronat auf die Hinterlaufperfusion .....	49
5.2	Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf die Hinterlaufperfusion.....	51

5.2.1	Ausdauertraining ohne Femoralarterienligatur verändert die Hinterlaufperfusion nicht	52
5.2.2	Ausdauertraining beschleunigt die Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur, die durch Clodronat inhibiert wird	54
5.3	Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf die Kollateralarterien im Hinterlauf	57
5.3.1	Ausdauertraining erhöht die Anzahl perivaskulärer Makrophagen und die Media-Dicke der Kollateralarterien	57
5.3.2	Arteriogenese versus Angiogenese	60
5.4	Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf den Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel	61
5.4.1	Ausdauertraining vor Femoralarterienligatur erhöht iNOS-Expression in mononukleären Zellen und Milz	61
5.4.2	Ausdauertraining erhöht die perivaskuläre Freisetzung von iNOS	62
5.4.3	NO-Quantifizierung im Adduktorengewebe	63
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>Dank</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
°	Grad
A. dest.	Aqua destillata
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CFI	collateral flow index
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
clod-ex	clodronate exercise (Clodronat und Ausdauertraining)
clod-sed	clodronate sedentary (Clodronat ohne Ausdauertraining)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FMN	Flavinmononukleotid
FSC	forward scatter
FSS	fluid shear stress (laminare Scherkraft)
g	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
µg, mg, g, kg	Mikrogramm, Milligramm, Gramm, Kilogramm
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzkrankheit
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
LDF	Laser Doppler Flowmetry
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse [kg/Mol]
M./Mm.	Musculus/Musculi
$\mu\text{m}$ , mm, m, km	Mikrometer, Millimeter, Meter, Kilometer
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	nicht signifikant
$\text{O}_2$	molekularer Sauerstoff
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
plac-ex	placebo exercise (Placebo und Ausdauertraining)
plac-sed	placebo sedentary (Placebo ohne Ausdauertraining)
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
rel.	relativ
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMC	smooth muscle cell
SSC	side scatter
TGF	tissue growth factor



TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodamin-5 (und -6)-isothiocyanat
u.a.	unter anderem
V.	Vena
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol.-%	Volumenprozent

# **1 Zusammenfassung / Summary**

## **1.1 Makrophagendepletion durch Clodronat-Liposomen inhibiert trainingsinduziertes Kollateralarterienwachstum**

Für das Kollateralarterienwachstum (Arteriogenese) sind sowohl Endothelfunktion als auch inflammatorische Zellen und Zytokine von Bedeutung. Ein vasoprotektiver Effekt von Ausdauertraining ist weitgehend anerkannt, wobei der genaue Mechanismus der trainingsinduzierten Arteriogenese nicht verstanden ist.

C57Bl6N-Mäusen wurden während einer dreiwöchigen Phase freiwilligen Laufens alle vier Tage 0,5 mg Clodronat-Liposomen bzw. Placebo-Liposomen i.v. injiziert, bevor sie einer einseitigen Femoralarterienligatur unterzogen wurden. Die Laufdistanz sank von  $5,5 \pm 1,0$  km und  $4,6 \pm 0,6$  km vor Ligatur auf  $0,9 \pm 0,4$  km (plac-ex) und  $0,6 \pm 0,1$  km (clod-ex) danach. Clodronat reduzierte zirkulierende Monozyten auf  $22,0 \pm 3,0$  % ( $p < 0,001$ ) der Kontrollgruppe (Liposomen ohne Clodronat) 24 h nach Injektion. Die Makrophagendichte des retikuloendothelialen Systems (Milz) verringerte sich auf  $4,1 \pm 0,2$  % ( $p = 0,004$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Hinterlaufperfusion wurde mittels Laser-Doppler-Perfusionsmessungen (LDF) vor und unmittelbar nach, sowie drei und sieben Tage nach Ligatur bestimmt. Unmittelbar nach Ligatur fiel die Perfusion (Verhältnis ligierter / nicht ligierter Hinterlauf) auf  $9 \pm 1$  % in nicht trainierten, mit Placebo behandelten Tieren (plac-sed) und auf  $10 \pm 1$  % in trainierten Placebo-behandelten Tieren (plac-ex) ab, entsprechend einem fehlenden Effekt des Trainings ohne Ligatur. Die Perfusionserholung verlief schneller und stärker in vor Ligatur trainierten Mäusen (Anstieg auf  $59 \pm 9$  % in plac-ex, verglichen mit  $53 \pm 8$  % in plac-sed nach Tag drei und auf  $73 \pm 8$  % in plac-ex verglichen mit  $48 \pm 7$  % in plac-sed ( $p < 0,05$ ) sieben Tage nach Ligatur). Im Gegensatz dazu war die Perfusionswiederherstellung in trainierten, mit Clodronat behandelten Tieren (clod-ex) nach drei Tagen erst bei  $35 \pm 5$  % und bei  $51 \pm 7$  % nach sieben Tagen, was vergleichbar mit der nicht trainierten Gruppe war (clod-sed,  $37 \pm 4$  % nach drei und  $33 \pm 5$  % nach sieben Tagen).

Die Quantifizierung der Kollateralarterien und perivaskulären Makrophagen wurde sieben Tage nach Ligatur immunhistochemisch durchgeführt. Parallel zu den Perfusionsergebnissen

war die Zunahme der durchschnittlichen Fläche der glatten Muskelzellen in den Kollateralarterien nach Clodronat-Behandlung signifikant geringer. Perivaskuläre Makrophagen waren in plac-ex erhöht, während sie in mit Clodronat behandelten Mäusen signifikant erniedrigt waren. Die Genexpression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) war lokal im Hinterlauf sowie systemisch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei plac-ex im Vergleich zu plac-sed erhöht.

Zusammenfassend erhöht Ausdauertraining vor einseitiger Femoralarterienligatur sowohl die Geschwindigkeit der Perfusionswiederherstellung als auch die mononukleäre iNOS-Expression. Die Perfusionszunahme wird durch eine systemische Makrophagendepletion verlangsamt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle bei der trainingsinduzierten Arteriogenese einnehmen.

## **1.2 Macrophage depletion using clodronate liposomes delays exercise-induced collateral artery growth**

Collateral artery growth (arteriogenesis) depends on endothelial function and inflammatory cytokines. A vasculoprotective effect of physical exercise is widely accepted. The exact mechanisms of exercise-induced collateral artery growth are incompletely understood.

C57Bl6 mice were treated with 0.5 mg of liposomal clodronate i.v. every four days during a three week voluntary running period before unilateral femoral artery ligation. Running distance dropped from  $5.5 \pm 1.0$  km (placebo exercise, plac-ex) and  $4.6 \pm 0.6$  km (clodronate exercise, clod-ex) before ligation to  $0.9 \pm 0.4$  km (plac-ex) and  $0.6 \pm 0.1$  km (clod-ex) afterwards. Clodronate reduced circulating monocytes to  $22,0 \pm 3,0$  % ( $p < 0,001$ ) of control (liposomes without clodronate) 24 h after injection. In the reticuloendothelial system (spleen), macrophage content fell to  $4.1 \pm 0.2$  % ( $p = 0,004$ ) of control.

Hindlimb perfusion was assessed by laser Doppler flowmetry (LDF) before and after ligation, as well as three and seven days thereafter. Directly after ligation, perfusion (ratio ligated / non-ligated hindlimb) fell to  $9 \pm 1$  % in placebo sedentary (plac-sed) and to  $10 \pm 1$  % in placebo exercising mice (plac-ex). Perfusion restoration was faster and more pronounced in exercising mice (increase to  $59 \pm 9$  % in plac-ex compared to  $53 \pm 8$  % in plac-sed on day three and to  $73 \pm 8$  % in plac-ex compared to  $48 \pm 7$  % in plac-sed ( $p < 0.05$ ) seven days after ligation). In contrast, in clod-ex, perfusion recovery was only  $35 \pm 5$  % after three and

51 ± 7 % after seven days, which was comparable to the sedentary group (clod-sed, 37 ± 4 % after three and 33 ± 5 % after seven days).

Immunohistochemistry was used to quantify collateral arteries and surrounding perivascular macrophages seven days after ligation. Similar to perfusion ratio, average smooth muscle cell area of collateral arteries increased with exercise to a significantly lesser extent so after clodronate treatment. Perivascular macrophages increased in plac-ex with a significant decrease in clodronate treated mice. Inducible NO-synthase (iNOS) mRNA in peripheral blood mononuclear cells increased in plac-ex compared to plac-sed, displaying a systemic response to exercise.

Exercise prior to femoral artery ligation increases the speed of perfusion restoration and increases mononuclear iNOS expression. The perfusion increase is delayed by macrophage depletion. These data suggest that, next to a beneficial effect on vascular endothelium, physical exercise relies on monocytes/macrophages as the other key player in arteriogenesis.

## 2 Einleitung

### 2.1 Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen die Liste der häufigsten Todesursachen und Behinderungen weltweit deutlich an<sup>88</sup>. In Deutschland sind ca. 40 % aller Sterbefälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen<sup>75</sup>. Trotz wachsenden Problembewusstseins der Risikofaktoren<sup>89</sup> und der daraus folgenden Prävention, wird angenommen, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch bis zum Jahr 2030 weiterhin ansteigen<sup>88</sup>, während infektiöse Todesursachen stetig abnehmen werden<sup>87</sup>.

Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen entstehen durch Atherosklerose, einer stenosierenden Gefäßerkrankung<sup>44</sup>. Dazu gehören u.a. die koronare Herzkrankheit (KHK), aber auch der ischämische Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die wesentlich zur Morbidität der betroffenen Patienten beiträgt<sup>87</sup>.

Mit zunehmender Lebenserwartung steigt auch die Prävalenz derartiger Erkrankungen. Eine ausgeprägte koronare Kollateralisierung geht mit einer verminderten Gesamtsterblichkeit einher<sup>71</sup>. Trotz besseren und erfolgversprechenderen therapeutischen Möglichkeiten scheint es dennoch nicht möglich, die Mortalität wesentlich zu beeinflussen. Auch moderne interventionelle Verfahren, wie die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), oder herzchirurgische Eingriffe, wie Bypass-Operationen, sind aufgrund vorhandener Komorbiditäten nicht immer einsetzbar. Etwa 20-30 % der Patienten kommen für diese Therapieformen aufgrund weit fortgeschrittener atherosklerotischer Gefäßablagerungen nicht in Frage<sup>70</sup>.

Nicht zuletzt aus diesen Gründen kommt der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eine ganz besondere Rolle zuteil. Die Arteriogenese beschreibt ein Verfahren, bei dem präexistente Kollateralarterien nach Verschluss einer Arterie an Größe gewinnen und den verminderten Blutfluss unter Umgehung des Hauptgefäßes kompensieren<sup>82</sup>. Es handelt sich hierbei um natürliche Bypässe.

Diese interarteriellen Verbindungen – auch Anastomosen genannt – sind bereits bei gesunden Menschen vorhanden. Obwohl man bis heute noch oft in Lehrbüchern findet, dass Herzkranzarterien funktionelle Endäste sind, konnte bereits 1964 gezeigt werden, dass es auch

Kollateralkreisläufe zwischen den Koronararterien gibt<sup>21</sup>. Patienten mit einer ausgeprägten Kollateralisierung der Koronargefäße haben eine 36 % geringere Sterblichkeit als Patienten, bei denen dies nicht der Fall ist<sup>47</sup>. Nach einer akuten Gefäßokklusion konnte eine ausreichende Kollateralisierung nur bei etwa einem Viertel von gesunden Probanden gefunden werden<sup>90</sup>, während es bei KHK-Patienten bis zu ein Drittel der Patienten waren<sup>48, 69</sup>. Genetische Faktoren könnten hierbei eine Rolle spielen<sup>63</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass ein inaktiver Lebensstil ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit sich bringt<sup>12</sup>. Empfohlen wird daher ein aktiver Lebensstil mit einem Minimum von 150 Minuten moderater körperlicher Bewegung pro Woche<sup>60</sup>. Hierbei gilt jedoch, dass geringe körperliche Aktivität besser als keine ist<sup>45</sup> und das Kosten-Nutzen-Verhältnis linear ansteigt<sup>60, 66</sup>. Moderates Ausdauertraining verbessert nicht nur die Lebensqualität, sondern auch die Hospitalisierungsrate und die Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse nach Stent-Implantationen<sup>2</sup>. Es hat sich herausgestellt, dass regelmäßiges Gehen neben einem positiven Einfluss auf die Hämostase<sup>86</sup> und inflammatorische Prozesse<sup>16</sup> sogar die Gesamtsterblichkeit senken kann, unabhängig von kardiovaskulären Ereignissen<sup>29</sup>. Gehtraining erhält als einzige Maßnahme zur Behandlung der Claudicatio intermittens bei pAVK eine Klasse-IA-Empfehlung laut aktuellen ESC (*European Society of Cardiology*)-Leitlinien<sup>77</sup>.

## 2.2 Grundlagen des Gefäßwachstums

Fast jedes Gewebe im Körper ist auf eine ausreichende Sauerstoffzufuhr und damit auf den Anschluss an ein arterielles Blutgefäß angewiesen. Dem menschlichen Organismus stehen verschiedene Möglichkeiten des Gefäßwachstums zur Verfügung.

Die Vaskulogenese beschreibt dabei einen Vorgang aus der Embryogenese, bei dem es zu einer In-situ-Ausdifferenzierung von undifferenzierten Angioblasten kommt<sup>9</sup>.

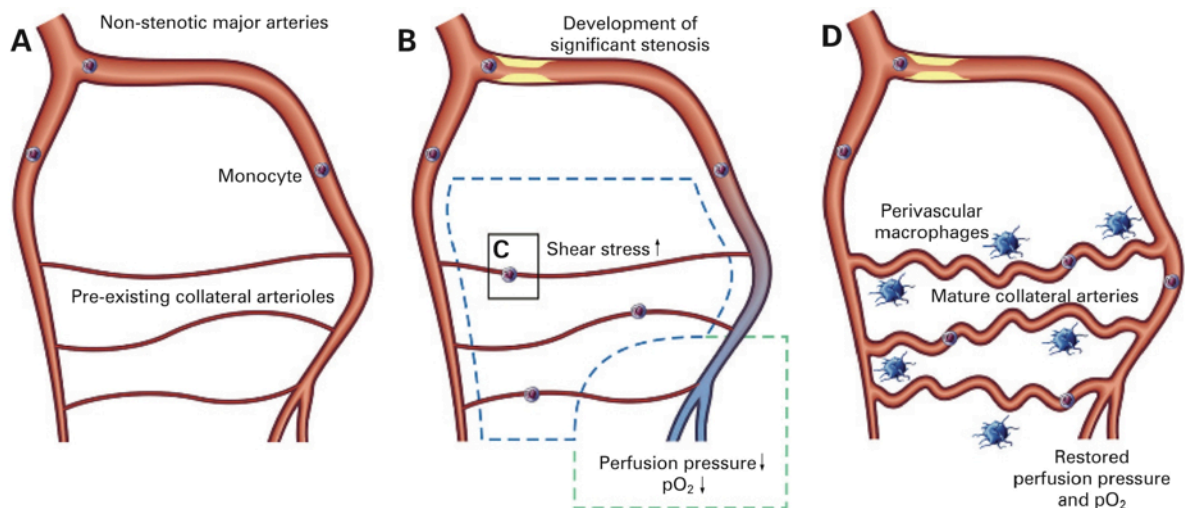
Nach der Geburt entstehen neue Gefäße hauptsächlich durch Angiogenese<sup>57</sup>. Der Reiz für diese Form des Gefäßwachstums ist die Hypoxie, also eine Minderversorgung des Gewebes durch Sauerstoff<sup>39</sup>. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Kapillaren<sup>9, 32</sup>.

Die Arteriogenese beschreibt das aktive Größenwachstum präexistenter Kollateralarterien nach Verschluss einer großen Arterie<sup>18</sup>. Dieser Prozess ist größtenteils abhängig von

mechanischen Reizen, den laminaren Scherkräften (*fluid shear stress*, FSS)<sup>36, 55</sup>. Durch den Verschluss einer Arterie kommt es zu einer Änderung der Strömungsverhältnisse. Es fließt mehr Blut durch bereits existierende Kollateralarterien, was den FSS in diesen Arterien erhöht und somit den Beginn der Arteriogenese initiiert. Durch den erhöhten FSS kommt es zur Endothelaktivierung, die ihrerseits wiederum eine Kaskade von Zytokinfreisetzungen und Enzymaktivierungen mit sich bringt, die letztendlich eine Proliferation und Größenzunahme der Tunica media, des muskulären Anteils der Arterie bewirken<sup>14</sup>. Für die Arteriogenese ist – im Gegensatz zur Angiogenese – keine Hypoxie erforderlich<sup>39</sup>. Hypoxie scheint sogar eher die für das Kollateralarterienwachstum erforderlichen Monozyten in ihrer Funktion zu hemmen<sup>26</sup>.

## 2.3 Stimulation der Arteriogenese

Der zeitliche Ablauf des Kollateralarterienwachstums ist in vier zeitlich nacheinander ablaufenden Phasen unterteilt<sup>62</sup>.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Arteriogenese<sup>64</sup>**

*Ansicht einer physiologischen Gefäßsituation zweier großer Arterien mit präexistenten Kollateralarterien, die beide Strombahnen miteinander anastomosieren (A). Nach hochgradiger Stenose einer der beiden Arterien kommt es zu einem vermehrten Blutfluss durch die Kollateralarterien (B) und damit verbundenen erhöhten laminaren Scherkräften (C). Der erhöhte Blutfluss in den Kollateralarterien hat über eine Aktivierung des Endothels und einer Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen zu einem Umbau dieser Gefäße geführt. Der initiale Blutfluss der stenosierte Arterie kann nun nahezu vollständig kompensiert werden (D).*

In der ersten Phase unmittelbar nach Gefäßokklusion kommt es zu einer akuten Änderung des Blutflusses durch die präexistenten, aber noch kleinkalibrigen Kollateralarterien. Durch den erhöhten FSS kommt es über eine Aktivierung von Integrinen<sup>72</sup> zu phänotypischen Veränderungen der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen zu proliferierenden Zellen<sup>61</sup>, was durch den höheren Gehalt an Ribosomen und der geringeren Anzahl an rauem endoplasmatischem Retikulum deutlich wird<sup>67</sup>. Weitere Vermittler zwischen FSS und Endothel scheinen neben Calcium-Ionenkanälen und Zytoskelettveränderungen auch Integrine und die endotheliale Glykokalix darzustellen<sup>28, 56, 85</sup>. VEGF scheint diesen Vorgang zu unterstützen<sup>13</sup>. Das durch FSS aktivierte Endothel exprimiert Adhäsionsmoleküle, wie *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und ICAM-2 und *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 an der Endotheloberfläche<sup>67</sup> und setzt Stickstoffmonoxid (NO) frei (s. 2.4). Zirkulierende Monozyten werden von Adhäsionsmolekülen chemotaktisch angelockt und binden mit ihrem Mac-1-Rezeptor an das endotheliale ICAM-1. Über Proteasen (u.a. *matrix metalloproteinases*-2 und -9) werden die *Tight-Junctions* des Endothels überwunden, wodurch es zu einer Durchwanderung der Monozyten in den perivaskulären Raum und einer Differenzierung zu Makrophagen kommt<sup>11, 85</sup>. Hieran sind auch Thrombozyten beteiligt<sup>10</sup>. Im perivaskulären Raum sind Makrophagen für ein arteriogenes inflammatorisches Milieu verantwortlich. Eines dieser proinflammatorischen Zytokine ist der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )<sup>1</sup>. Eine antiinflammatorische Behandlung mit Aspirin führte im Kaninchenmodell zu einer Hemmung des Kollateralarterienwachstums<sup>35</sup>. Darüber hinaus produzieren Makrophagen MCP-1, um weitere Monozyten chemotaktisch anzulocken. Eine Produktion von *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) führt zur Ausschüttung von parakrin wirkenden mitogenen Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF)<sup>5</sup>. Der *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) schützt die Makrophagen dabei vor der Apoptose<sup>6</sup>.

Während der zweiten und dritten Phase steht die kontrollierte Destruktion des die Kollateralarterien umgebenden Gewebes durch proteolytische Prozesse im Vordergrund, wobei es zur starken mitotischen Aktivität der Endothelzellen und glatten Muskelzellen kommt<sup>62</sup>. Anschließend findet die Reifung und Sortierung der gefäßbildenden Zellen, wie beispielsweise die zirkuläre Anordnung der glatten Muskelzellen, statt. Die Proteasen MMP-2 und MMP-9 lysieren dabei die Lamina elastica interna und externa der Kollateralarterien, um ausreichend Raum für das Wachstum zu schaffen<sup>7, 8</sup>. Nach einigen Zellzyklen nehmen Endothelzellen und glatte Muskelzellen ihren ursprünglichen Phänotyp wieder an.



In der vierten und letzten Phase werden nicht erforderliche Kollateralarterien abgebaut. Die Mehrzahl der initial durch den erhöhten FSS rekrutierten Gefäße werden im Rahmen des „Prunings“ wegen eines Konkurrenzdrucks zugunsten der verbleibenden durchmesserstärkeren Kollateralarterien durch überschüssige Proliferation der Intima okkludiert<sup>34</sup>. Die wenigen verbleibenden Konduktanzarterien kompensieren den Blutfluss der verschlossenen Hauptarterie.

In einem arteriovenösen Shunt-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es durch diesen anhaltenden mechanischen Reiz sogar zu einer Überkompensation kommen kann, sodass die Kollateralarterien des ligierten Hinterlaufs mehr als 100 % des Blutflusses der anderen unligierten Seite ermöglichen<sup>17, 91</sup>.

Eine weitere Möglichkeit einen erhöhten FSS hervorzurufen ist Ausdauertraining. Körperliche Aktivität scheint das Kollateralarterienwachstum positiv zu beeinflussen<sup>53, 59, 68, 76</sup>.

## 2.4 Rolle von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Radikal, das als bioaktives Molekül sowohl autokrin als auch parakrin wirken kann<sup>52</sup>. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der schnellen Oxidation zu Nitrat und Nitrit konnte NO lange Zeit nicht eindeutig nachgewiesen werden<sup>25</sup>.

Nitroglycerin wurde bereits im 19. Jahrhundert zur Behandlung der Angina Pectoris eingesetzt, doch erst 1977 wurde diese gefäßerweiternde Wirkung kausal mit NO in Zusammenhang gebracht<sup>41</sup>. 1980 wurde nachgewiesen, dass Acetylcholin eine Vasodilatation bewirken konnte, allerdings nur bei intaktem Endothel<sup>22</sup>. Es wurde auf eine endothelvermittelte vasodilatatorische Substanz geschlossen, dem *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Erst später konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei EDRF um NO handelte<sup>23, 37, 54</sup>.

NO wird aus der Reaktion der Aminosäure L-Arginin mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zu Citrullin freigesetzt<sup>49</sup>. Das Enzym NO-Synthase katalysiert diese NADPH-abhängige Reaktion<sup>73</sup>.

Es existieren drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase im menschlichen Körper<sup>58</sup>. Die neuronale NOS (nNOS, NOS1) befindet sich im Nervensystem, die endotheliale NOS (eNOS,

NOS3) wird von Endothelzellen exprimiert. Beide sind verantwortlich für die kontinuierliche basale Freisetzung von NO und benötigen einen  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex zur Aktivierung<sup>25, 74</sup>. Das von diesen beiden Enzymen produzierte NO dient als Signalmolekül, u.a. als Neurotransmitter und Vasodilatator<sup>50</sup>.

Die dritte bekannte Isoform der NO-Synthasen ist die induzierbare NOS (iNOS, NOS2). Diese NOS wird  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und nur nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie LPS, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  transkriptionell aktiviert<sup>50</sup> und setzt über mehrere Stunden NO frei<sup>42</sup>. Die iNOS kann von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und dient primär der Abwehr gegen intrazelluläre Erreger, was die hohe Konzentration des freigesetzten NO erklärt<sup>25</sup>.

NO aktiviert die zyklische Guanylatzyklase in den glatten Muskelzellen und führt über die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zu deren Relaxation. Die Folge ist eine arterielle Vasodilatation<sup>4</sup>.

Dass NO eine essentielle Rolle in der Arteriogenese spielt, ist anerkannt. Auch wenn ein großer Teil des NO während des Kollateralarterienwachstums von der eNOS in Endothelzellen produziert wird<sup>15, 43</sup>, führt doch die Hemmung dieses Enzyms in einem Knock-Out-Mausmodell nicht zur kompletten Inhibition der Arteriogenese<sup>38, 46</sup>. Der genaue Ursprung des NO muss demnach an einer anderen Stelle gesucht werden. Ein möglicher Ansatz ist die iNOS, die von mononukleären Zellen gebildet wird.

## **2.5 Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit soll im Mausmodell gezeigt werden, dass Ausdauertraining das Kollateralarterienwachstum stimuliert. Es soll überprüft werden, ob dies bereits vor Verschluss der Femoralarterie, d.h. durch einen endothelunabhängigen Mechanismus geschieht. Hierzu soll ein Verfahren zur systemischen Monozytendepletion mithilfe von Clodronat-Liposomen etabliert werden. In diesem Zusammenhang soll die besondere Rolle der Monozyten bei der Arteriogenese in Kombination mit Ausdauertraining untersucht werden. Zum Schluss soll die arteriogene Wirkung des durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) gebildeten NO und deren Herkunft geklärt werden, um mögliche neue Therapieansätze daraus ableiten zu können.

### 3 Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6,0 Seide (geflochten)	Feuerstein GmbH, Berlin
Cellstar Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Combitips (1,25 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Dako Pen	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 24 x 60 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Einwegskalpelle	Aeskulap AG, Tuttlingen
FACS-Röhrchen (Polystyrol-Rundbodenröhrchen 5 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Konische Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp 96 well plates	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Microlance 3 Injektionskanüle 20G	BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA
Microlance 3 Injektionskanüle 26G	BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor Co. Ltd. Medical Division, Osaka, Japan
Objektträgerkasten	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polysine Microscope Slides	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette K2E (EDTA) (2,7 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

#### 3.2 Chemikalien / Reagenzien / Kits

Produkt	Hersteller
[3H]-Arginin-Monohydrochlorid (1 µCi/µl)	Amersham, Arlington Heights, IL, USA
0,9 % NaCl-Lösung	B. Braun AG, Melsungen

10x PBS-Liposomen	ClodLip BV, Haarlem, Niederlande
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Absolutely RNA Micropep Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Adenosin (6 mg/2 ml)	Sanofi Aventis, Frankfurt
Aqua ad injectabilia (Ampuwa)	B. Braun AG, Melsungen
Aqua destillata	B. Braun AG, Melsungen
BD FACS Lysing Solution (Erythrozytenlyse)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
BSA (Album bovine fraction V, pH 7.0)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Clodronat-Liposomen	ClodLip BV, Haarlem, Niederlande
CountBright Absolute Counting Beads	Invitrogen, Eugene, OR, USA
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen, Eugene, OR, USA
FluoSpheres Polystyrene Microspheres, Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #2, 15 µm	Invitrogen, Eugene, OR, USA
HCl (conc.) (Chlorwasserstoff)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Heparin-Na Braun, 10.000 IE/ml	B. Braun AG, Melsungen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Isofluran (Furane)	Baxter, Deerfield, IL, USA
KCl (Kaliumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml)	Pfizer, Berlin
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
Microfil compound MV-122	Flow Tech Inc., Carver, MA, USA
N <sub>2</sub> , flüssig	Air Liquide, Paris, Frankreich
Na-Azid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NOSdetect Assay Kit	Agilent Technologies, La, Jolla, CA, USA

Paraformaldehyd	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
peqGOLD RNA Pure	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Proteinase K	Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA
Rimadyl Injektionslösung (Carprofen)	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Rompun (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tissue Tek Compound Einbettmedium	Wecker Labortechnik, Kitzingen
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	VWR, Löwen, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

### 3.3 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
<b>1 M Tris</b>	<b>Für 500 ml:</b> 60,6 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan 500 ml Ampuwa pH 6,8
<b>10 % SDS</b>	<b>Für 500 ml:</b> 50 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 500 ml Aqua dest.
<b>10x PBS (-Tween)</b>	<b>Für 1000 ml:</b> 80 g NaCl 2 g KCl 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l mit A. dest. pH 7,4 (10 ml Tween 20)
<b>1x PBS (-Tween)</b>	1:10-Verdünnung von 10x PBS (-Tween)
<b>4 % PFA</b>	<b>Für 100 ml:</b> 4 g Paraformaldehyd 100 ml 1x PBS
<b>Erythrozytenlyse für FACS</b>	<b>Für 3 ml:</b> 0,3 ml Erythrozytenlyse 2,7 ml Aqua dest.

<b>FACS-Puffer</b>	<b>Für 500 ml:</b> 500 ml 1x PBS 25 ml FCS 2,5 g BSA 0,35 g Na-Azid
<b>Lysepuffer</b> (Mikrosphärenperfusion)	<b>Für 100 ml:</b> 10 ml 10 % SDS 0,5 mg Na-Azid 800 µl Tween 80 5 ml 1 M Tris, pH 8,0 85 ml Aqua dest. Proteinase K 33,3 mg
<b>Perfusionspuffer</b> (Mikrosphärenperfusion)	<b>Für 1000 ml:</b> 994 ml 0,9 % NaCl 1 ml Tween 20 5 ml Adenosin (3 mg/ml)

### 3.4 Primer für PCR

(Eurofins Genomics, Ebersberg)

Target	Primer
mm18S	fwd: 5' TCA ACA CGG GAA ACC TCA C 3' rev: 5' ACC AGA CAA ATC GCT CCA C 3'
mmiNOS	fwd: 5' CAA GCA CCT TGG AAG AGG AG 3' rev: 5' AAG GCC AAA CAC AGC ATA CC 3'
mmHPRT	fwd: 5' CTG TGG CCA TCT GCC TAG TAA A 3' rev: 5' GGC TCA TAG TGC AAA TCA AAA GTC 3'

### 3.5 Antikörper für Immunhistochemie

#### 3.5.1 Primärantikörper

Produkt	Hersteller
Rabbit anti-iNOS polyclonal antibody, ab15323 (0,2 mg/ml)	Abcam Inc., Cambridge, UK
Monoclonal anti-Mouse $\alpha$ -smooth muscle	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

actin-FITC antibody	
Rat anti-mouse CD31 antibody, Clone ME 13.3	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Rat anti-mouse F4/80 monoclonal antibody, IgG2b	AbD Serotec, Kidlington, UK

### 3.5.2 Sekundärantikörper

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor 635 goat anti-rabbit	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-Rat IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Goat anti-rat FITC-antibody, IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Goat anti-rat TRITC-antibody, IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Rhodamine (TRITC-) AffiniPure donkey anti-goat IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA

### 3.6 Antikörper für FACS

Produkt	Hersteller
Anti-Mouse Ly6C / CD115 / CD11b Triple Color Reagent	AbD Serotec, Kidlington, UK

### 3.7 Computersoftware

Produkt	Hersteller
EndNote X6	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Lucia G 4.6	Informer Technologies Inc., London, UK

Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
MoorLDI V5 PC Software	Moor Instruments, Axminster, UK
NIS-Elements BR 3.22.10	Nikon GmbH, Düsseldorf
Prism 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
SPSS Statistics 20.0.0	IBM Corp., Armonk, NY, USA
StepOne Software v2.0	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

### 3.8 Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Druckgeregeltes Perfusionssystem für Perfusion mit Mikrosphären-Perfusionslösungen	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
Einkanalpipetten, mechanisch	VWR International, Darmstadt
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Mailand, Italien
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
HandyStep electronic Handdispenser	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Heizkissen TM 20	Beurer GmbH, Ulm
Homogenisator Potter S	B. Braun AG, Melsungen
Ika Topolino Magnetrührer	Ika Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Leica CM1900-Kryostat	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope: Leica TCS SP5 II Nikon DXM 1200F Nikon SMZ 800 Mit KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Leica Camera AG, Wetzlar Nikon GmbH, Düsseldorf Nikon GmbH, Düsseldorf Schott AG, Mainz
Moor LDI2-HR	Moor Instruments, Axminster, UK
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstedt
Px2 Thermal Cycler	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA



Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sigma Sport BC 401 Tachometer	Sigma-Elektro GmbH, Neustadt
Sonorex RK 31 0,9 l Ultraschallreiniger	Bandelin Electronics, Berlin
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Szintillationszähler Wallac 1400 DAS	Wallac Scintillation Products, Turku, Finnland
Vortex VV3	VWR International, Darmstadt
Waagen:	
ALC-Series Precision Analytical Balances (0,0001 g)	Acculab UK, Edgewood, NY, USA
VIC-Series Precision Balances (0,01 g)	Acculab UK, Edgewood, NY, USA
Zentrifugen:	
Heraeus Biofuge Pico	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Heraeus Labofuge 400R	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Napco 2019R refrigerated microcentrifuge	Napco, Winchester, VA, USA

## **4 Methoden**

### **4.1 Versuchstierbehandlung**

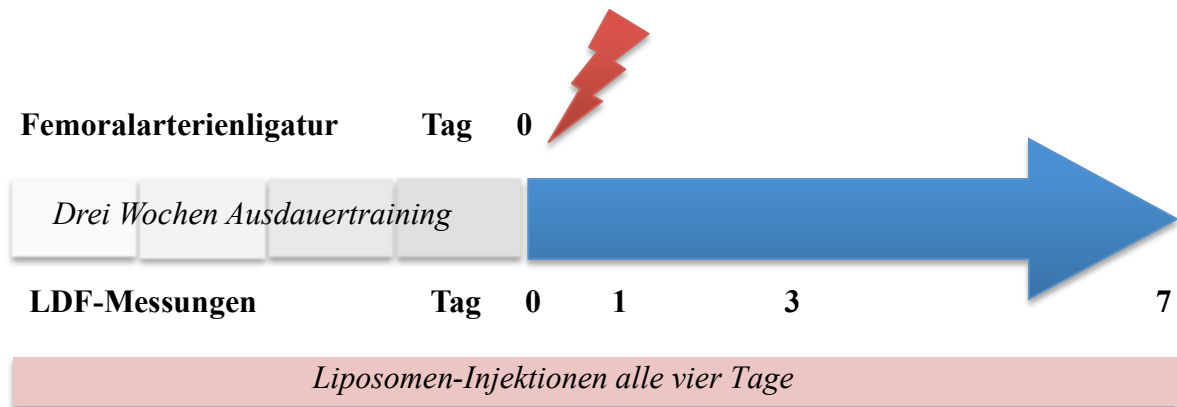
#### **4.1.1 Allgemeines**

Die im Folgenden durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes unter den Versuchsnummern 22/2010 und 29/2011 von den zuständigen Behörden genehmigt und unterlagen der regelmäßigen Kontrolle durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes.

Für alle Versuche wurden acht bis zwölf Wochen alte C57Bl/6N-Mäuse verwendet.

#### **4.1.2 Käfighaltung und Ausdauertraining**

Die Mäuse wurden aufgeteilt nach Ausdauertraining und nicht trainierender Kontrollgruppe. Für das Ausdauertraining wurden jeweils zwei Mäuse paarweise aus derselben Behandlungsgruppe, Clodronat oder Placebo, auf einen großen Käfig mit je zwei Laufrädern aufgeteilt. In jedem Käfig war eines der beiden Laufräder mit einem Tachometer ausgerüstet, auf dem die Laufdistanz abgelesen werden konnte. Es wurde hierbei vorausgesetzt, dass beide Laufräder gleichmäßig verwendet wurden. Alle anderen, nicht trainierenden Mäuse, wurden in Gruppen von nicht mehr als acht Tieren pro Käfig gehalten. Wasser und Futter standen den Versuchstieren jederzeit zur freien Verfügung. Die in die Trainingsgruppe randomisierten Mäuse wurden drei Wochen vor Femoralarterienligatur in die Laufradkäfige gesetzt. Außerdem begann in dieser Zeit für alle Gruppen die regelmäßige Applikation der Liposomen. Nach drei Wochen Ausdauertraining wurde bei allen Mäusen eine Femoralarterienligatur durchgeführt. In der darauffolgenden Woche wurde mittels regelmäßiger Laser-Doppler-Messung die Hinterlaufperfusion dokumentiert.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes**  
*Das Ausdauertraining begann bereits drei Wochen vor Femoralarterienligatur. Laser-Doppler-Messungen vor Ligatur, sowie an den Tagen 0, 1, 3 und 7. Während des gesamten Versuches wurden alle vier Tage 100 µl Liposomen (Placebo bzw. Clodronat) injiziert.*

#### 4.1.3 Narkosen

Die kurzzeitige Narkose für die intravenösen Injektionen wurde mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran durchgeführt. Hierzu wurde ein luftdicht verschlossener Plastikkäfig mit einem Gasgemisch aus 5 Vol.-% Isofluran und reinem Sauerstoff gefüllt, in dem die Mäuse bis zum Eintreten der Narkose verblieben. Auf diese Weise konnte schonend eine etwa 30-sekündige Narkose aufrechterhalten werden, die für eine retrobulbäre i.v.-Injektion ausreichte. Die Tiere wurden noch vor Abatmen des Gases zurück in ihren Käfig gesetzt und haben somit nur eine geringe Belastung erfahren.

Für längere Eingriffe, wie die Femoralarterienligatur oder auch für eine Laser-Doppler-Perfusionsmessung, bei der die Tiere für etwa vier Minuten vollkommen ruhig liegen mussten, wurde eine Injektionsnarkose bevorzugt. Diese bestand aus einem Gemisch aus 1 ml Xylazin (20 mg/1 ml) und 2 ml Ketamin (100 mg/1 ml), das mithilfe von NaCl-Lösung auf 1:10 verdünnt wurde. Die Dosierung betrug etwa 300 µl/20 g Körpergewicht der Maus.

#### **4.1.4 Blutentnahmen**

Die Blutentnahmen für die Blutbilduntersuchungen nach Clodronat-Injektionen wurden aus der V. facialis entnommen. Aufgrund der teilweise täglichen Blutentnahmen wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert, um die Belastung so gering wie möglich zu halten.

Mit einer 20G-Injektionskanüle wurde 3-4 mm dorsokaudal des Haarwirbels im Unterkieferbereich punktiert. Das Blut wurde zur Gerinnungshemmung in einer mit 4,3 mg EDTA gefüllten Monovette aufgefangen. Durch eine Fixierung der Nackenhaut und einem damit einhergehenden Zurückziehen der Gesichtshaut wurden die Venen gestaut. Nach erfolgter Blutentnahme wurde die Einstichstelle für kurze Zeit komprimiert um einen zusätzlichen Blutverlust und eine Hämatombildung zu vermeiden.

#### **4.1.5 Injektionen der Clodronat-Liposomen**

Alle Clodronat-Injektionen wurden i.v. in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Hierzu wurden die Mäuse kurzzeitig mittels einer Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Für die Injektion wurde eine 26G-Injektionskanüle und eine 1 ml-Spritze verwendet, in dem sich die leicht angewärmte und sorgfältig durchmischte Liposomenlösung befand. Die Einstichstelle für die Retrobulbärinjektion befand sich am medialen Augenwinkel. Der Einstichkanal verlief medial des Augenbulbus innerhalb der Orbita sagittal und parallel zur Körperachse. Die Liposomen wurden langsam und unter Beobachtung der Einstichstelle injiziert.

#### **4.1.6 Tötung und Organentnahme**

Die Tötung erfolgte entweder mit einer zehnfach höheren Narkose-Dosis als für die Femoralarterienligatur oder mittels zervikaler Luxation.

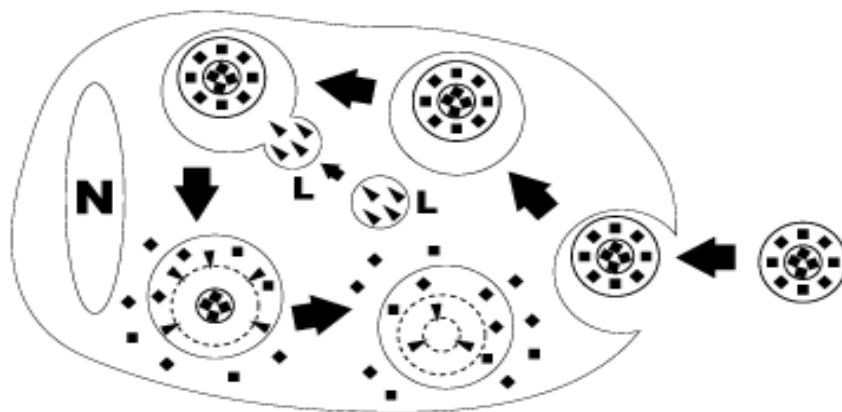
Es wurden regelmäßig der M. adductor magnus und die Milz entnommen. Für die Milzentnahme erfolgte post mortem eine mediane Laparotomie, bei der die Milz nach Entfernen des Darmes zugänglich war. Da präexistente Kollateralen zwischen A. femoralis und A. profunda femoris größtenteils in der Adduktorenmuskulatur zu finden sind, wurde

diese für histologische Ausarbeitungen entnommen. Die Entnahme des M. adductor magnus erfolgte nach Entfernung des Felles und mit Sicht auf die gesamte Oberschenkelmuskulatur. Der M. adductor magnus entspringt aus dem Beckenknochen und inseriert am Femur, weshalb man die gesamte Muskulatur zwischen Hüftknochen und Kniegelenk medial des Femurs in einem Block entnimmt. Wichtig ist dabei, auf die Ausrichtung des Muskelgewebes zu achten. Um die Kollateralarterien des M. adductor magnus quer anschneiden zu können, musste der Muskelblock unmittelbar nach Entnahme so eingebettet werden, dass axiale Schnitte erstellt werden konnten.

## 4.2 Monozyten-/Makrophagendepletion mittels Clodronat-Liposomen

### 4.2.1 Wirkung der Clodronat-Liposomen

Für die systemische Depletion der Monozyten und Makrophagen wurden Clodronat-Liposomen verwendet. Clodronat (Dichloromethylen-Bisphosphonat,  $\text{Cl}_2\text{MBP}$ ) ist ein Bisphosphonat, das ummantelt von Liposomen durch Makrophagen phagozytiert wird<sup>80</sup>. Nach der Phagozytose wird die liposomale Phospholipiddoppelschicht durch lysosomale Phospholipasen abgebaut, wodurch es zur intrazellulären Freisetzung von Clodronat kommt.



**Abb. 3: Mechanismus der Liposomen-Phagozytose und Freisetzung des Clodronats**  
Dargestellt ist ein Makrophage mit Zellkern (N) und eine zeitliche Abfolge der Liposomen-Phagozytose. Nachdem die aufgenommenen Liposomen mit dem Lysosom (L) verschmolzen sind, löst sich die Phospholipiddoppelschicht auf und Clodronat (■) wird intrazellulär freigesetzt<sup>79</sup>.

Eine hohe intrazelluläre Konzentration von Clodronat führt zu irreversiblen metabolischen Schäden der Zelle und letztendlich zur Apoptose der Makrophagen<sup>78</sup>.

Die Konzentration der Liposomenlösung betrug 5 mg Clodronat pro 1 ml Suspension, 100 µl Liposomenlösung enthielten also 0,5 mg Clodronat.

Die Verwendung von Clodronat-Liposomen bringt viele Vorteile mit sich. Einerseits übt das Clodronat nur geringe systemische Nebenwirkungen aus, da es aufgrund seiner Hydrophilie die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Liposomen nicht passieren und somit entweichen kann. Nachdem die Liposomen phagozytiert worden sind und das Clodronat frei in der Zelle vorliegt, kann es auch wiederum die hydrophobe Zellmembran nicht überwinden, was zu hohen intrazellulären Konzentrationen führt. Sollte es durch Ruptur von Liposomen oder nach Apoptose befallener Makrophagen zur Freisetzung von Clodronat in die Blutbahn kommen, so verhindert die kurze Halbwertszeit und die rasche renale Elimination wiederum systemische Effekte. Andererseits macht die liposomale Darreichungsform eine spezifische makrophagenorientierte Depletion überhaupt erst möglich. Weder Liposomen noch Clodronat sind an sich toxisch, solange sie sich in extrazellulären Kompartimenten befinden. Eine mögliche Einschränkung dieser Methode ist die durch die Injektion selbst hervorgerufene inflammatorische Reaktion, wie sie auch bei den Placebo-Liposomen an der leicht verbesserten Perfusionswiederherstellung zu beobachten war. Allerdings traf dieser Effekt auf alle vier Gruppen zu.

#### **4.2.2 Etablierung des Clodronat-Injektionsschemas**

Da eine systemische Makrophagendepletion mithilfe von mit Clodronat gefüllten Liposomen eine noch sehr neue Methode war, musste vor Beginn der Experimente ein geeignetes Injektionsschema entwickelt werden. Sowohl Darreichungsform als auch Konzentration und Häufigkeit der Injektionen waren vollkommen unbekannt.

Prinzipiell stehen sowohl die intraperitoneale als auch die intravenöse Injektion zur Verfügung. Zu Beginn musste somit untersucht werden, ob eine der beiden Darreichungsformen der anderen in Wirkung oder unerwünschten Nebenwirkungen überlegen war. Hierzu wurden verschiedene vergleichende Schemata experimentell untersucht. Als vergleichende Negativkontrolle wurde der Kontrollgruppe eine Liposomenlösung injiziert, die

anstelle von Clodronat nur 10x PBS beinhaltete. Somit war die Behandlung der Placebo-Gruppe abgesehen vom Inhaltsstoff der injizierten Liposomen identisch.

Zunächst wurde jeweils die intravenöse Injektion von Clodronat-Liposomen mit der von Placebo-Liposomen verglichen, anschließend folgte der Vergleich bei intraperitonealer Injektion. Im Anschluss wurde die intravenöse mit der intraperitonealen Injektion verglichen. Da es sich im hier vorliegenden Experiment um einen mehrwöchigen Behandlungszeitraum handelte, mussten die Mäuse mehrfach behandelt werden. Auch hierfür musste ein Modell entwickelt werden, das sowohl in Hauptwirkung als auch Nebenwirkungsprofil den günstigsten Effekt hatte.

Die Messung der Hinterlaufperfusion wurde während der Etablierungsphase mit der Mikrosphärentchnik durchgeführt. Während dieser Zeit fand noch kein Ausdauertraining statt.

Durch Clodronat verursachte Nebenwirkungen wurden durch regelmäßige Kontrollen des Körpergewichtes der Mäuse quantifiziert, da es bei hohen Dosierungen während der Behandlungszeit zu Gewichtsabfall kam.

## **4.3 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)**

### **4.3.1 Grundlagen der FACS-Analyse**

Mithilfe der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen nach ihrer Größe, oberflächlichen Struktur und Fluoreszenz aufgeteilt werden. Hierzu werden die in Suspension befindlichen Zellen durch das FACS-Gerät angesaugt und mit verschiedenen Lasern angestrahlt, deren Emissionen analysiert werden. Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter, FSC*) gibt Auskunft über die Größe, das im 90°-Winkel aufgefangene Seitwärtstreulicht (*side scatter, SSC*) zeigt die Granularität der einzelnen Zellen an. Sofern die Zellen vor der Messung mit fluoreszierenden Antikörpern markiert worden sind, kann auch deren spezifische Fluoreszenz gemessen und dadurch die Zellen weiter differenziert werden.

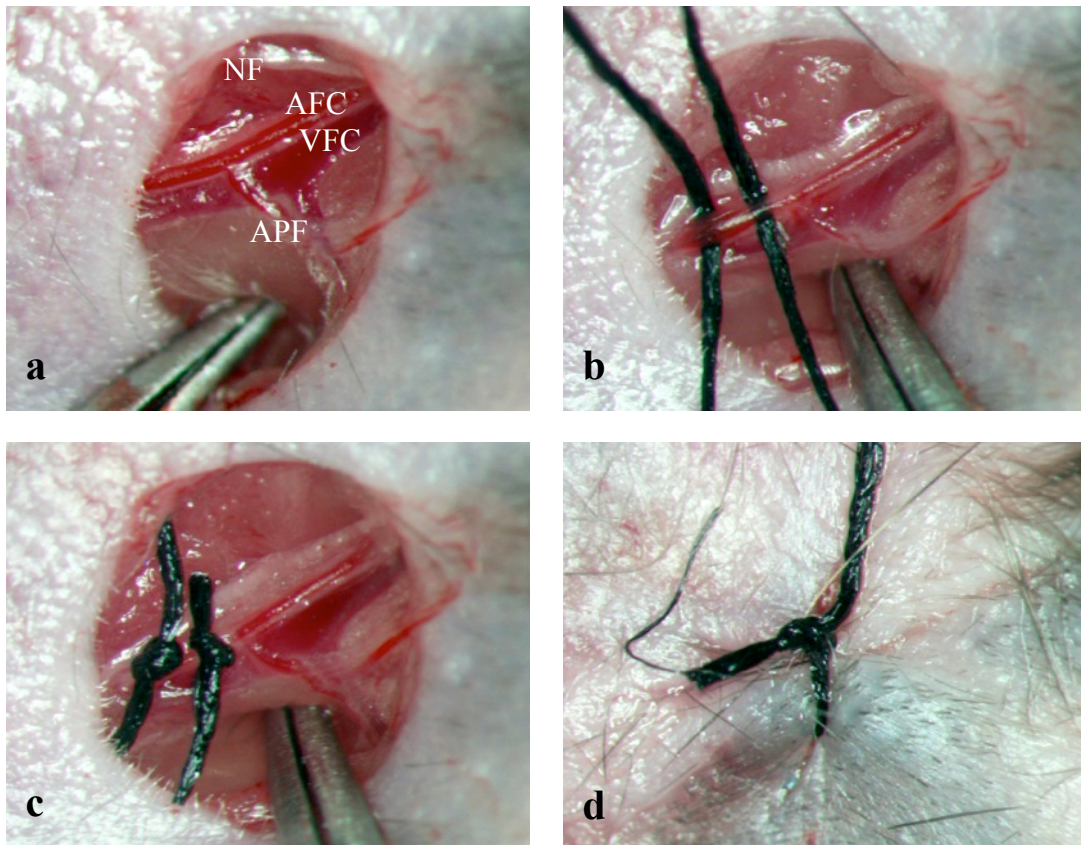
#### 4.3.2 Messung

50 µl zuvor gewonnenes Vollblut wurde in ein mit 2 ml gefülltes Rundbodenröhrchen gegeben. Außerdem wurden 25 µl fluoreszierende *Beads* hinzugefügt, um eventuelle unterschiedliche Absaugmengen in der späteren FACS-Analyse herausrechnen zu können. Anschließend wurden die Röhrchen durchmischt und 3 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der übrige zelluläre Anteil wurde mit 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend gründlich mit dem Vortex-Mixer durchmischt. Anschließend wurden 5 µl des dreifachen Antikörper-Mix (Ly6C, CD115, CD11b) hinzugegeben und nach erneutem gründlichen Durchmischen 45 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zur Lyse der Erythrozyten 3 ml Lysereagenz hinzugegeben, das wiederum 10 Minuten nach gründlichem Schütteln bei RT inkubierte. Im Anschluss wurde 1 ml FACS-Puffer hinzu pipettiert und erneut 3 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Im Rahmen des Waschvorgangs wurde ein weiteres Mal der Überstand abgesaugt und mit 2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nachdem ein letztes Mal zentrifugiert worden war, wurde der nun hauptsächlich aus Leukozyten bestehende Rest mit 300 µl resuspendiert und konnte im FACS gemessen werden.

#### 4.4 Femoralarterienligatur

Für die Ligatur der A. femoralis wurde zu Beginn der rechte proximale Oberschenkel mit einem Einmalrasierer rasiert. Anschließend wurde ein ca. 5 mm langer Hautschnitt gesetzt und der oberflächlich liegende Gefäßnervenstrang der Femoralgefäße aufgesucht (Abb. 4a). Nachdem der N. femoralis identifiziert und von den Gefäßen abgelöst worden war, wurde die A. profunda femoris aufgesucht. Im Anschluss daran wurden zwei Fäden (6,0 geflochtene Seide) unter die A. femoralis – distal des Abgangs der A. profunda femoris – gelegt (Abb. 4b). Zunächst wurde vorsichtig der proximale Faden zur Abbindung der Arterie zu einem Knoten gezogen. Der zusätzliche distale Knoten diente der vollständigen Unterbindung des Blutflusses (Abb. 4c). Weder Vene noch Nerv wurden hierbei beschädigt. Nach erfolgter Femoralarterienligatur wurde mit einer Einzelknopfnahmt der Hautschnitt verschlossen (Abb. 4d). Zur postoperativen Analgesie wurden 10 mg Carprofen s.c. injiziert.





#### **Abb. 4: Femoralarterienligatur**

*Ansicht des rechten Oberschenkels. Nach dem Hautschnitt wurden die Femoralgefäße aufgesucht (a). Die A. femoralis wurde distal des Abgangs der A. profunda femoris (APF) mit zwei Fäden ligiert (b, c). Anschließend wurde die Haut mit einer Einzelknopfnahrt verschlossen (d). AFC, VFC: A./V. femoralis communis, NF: N. femoralis, APF: A. profunda femoris.*

### **4.5 Perfusionsmessungen**

Zur Messung der Hinterlaufperfusion wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Der Vorteil der Mikrosphärenperfusionsmessung war, dass das Endothel durch eine medikamentös hervorgerufene maximale Vasodilatation keinen Einfluss auf die Durchblutung hatte. Die invasive Art der Messung hatte allerdings zur Folge, dass das Experiment terminal war und somit nur eine Messung pro Versuchstier zuließ. Hierin lag der entscheidende Vorteil der Laser-Doppler-Perfusionsmessung, die – wie unten beschrieben – einen longitudinalen Verlauf der Hinterlaufdurchblutung darstellen konnte.

Die Mikrosphärenperfusion wurde zur Etablierung der Clodronat-Behandlung eingesetzt, während die Laser-Doppler-Perfusionsmessungen angewendet wurden, um den Einfluss von Ausdauertraining auf das Kollateralarterienwachstum im zeitlichen Verlauf zu quantifizieren.

#### **4.5.1 Mikrosphärenperfusionsmessungen**

##### **Grundlagen**

Die Aorta wurde nach distal unter konstantem Druck mit Mikrosphären (Durchmesser 15  $\mu\text{m}$ ) perfundiert, die sich abhängig vom Widerstand der Gefäße auf die beiden Beine verteilten und dort in den Kapillaren festsetzten. Unter Zumischung von Adenosin und Nitroglycerin in das Perfusat wurde eine maximale Vasodilatation erreicht. Im Gegensatz zur LDF ist die Mikrosphärenperfusion somit endothelunabhängig. Da die rechte A. femoralis ligiert war, wurden die Mikrosphären durch die A. profunda femoris und deren Kollateralarterien auf dieser Seite umgeleitet. Die Menge der im rechten Unterschenkel angekommenen Mikrosphären wurde ins Verhältnis zum linken (nicht ligierten) Unterschenkel gesetzt und war proportional zur stattgefundenen Arteriogenese der Kollateralarterien.

Die Narkose erfolgte unter Zumischung von Heparin. Nach einer medianen Laparotomie wurden die großen Bauchgefäße freipräpariert und die Aorta abdominalis von der V. cava inferior vorsichtig getrennt. Bevor der Silikonkatheter in die Aorta eingeführt werden konnte, wurde diese oberhalb der Nierenarterien abgeklemmt und mit einer Gefäßschere vorsichtig eröffnet. Der Katheter wurde Richtung distal eingeschoben, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Öffnung des Katheters an der Spitze nicht weiter distal als bis zur Bifurkation der Aorta zu liegen kam, damit eine seitengleiche Perfusion der beiden unteren Extremitäten gewährleistet werden konnte. Der Katheter wurde mit einem Faden fixiert und an den Perfusionsschlauch angeschlossen. Außerdem wurde ein Druckabnehmer angeschlossen. Die initiale 30-sekündige Perfusion erfolgte mit dem Perfusionspuffer, der während der gesamten Perfusion auf ca. 38 °C erwärmt wurde. Damit Blut und Perfusionspuffer nach der Hinterlauf-Zirkulation ungehindert abfließen konnten, wurde die V. cava inferior eröffnet.

Die Perfusion erfolgte mit vier verschiedenfarbigen Mikrosphärensuspensionen mit jeweils ansteigenden Perfusionsdrücken für eine Dauer von jeweils zwei Minuten. Die Konzentration

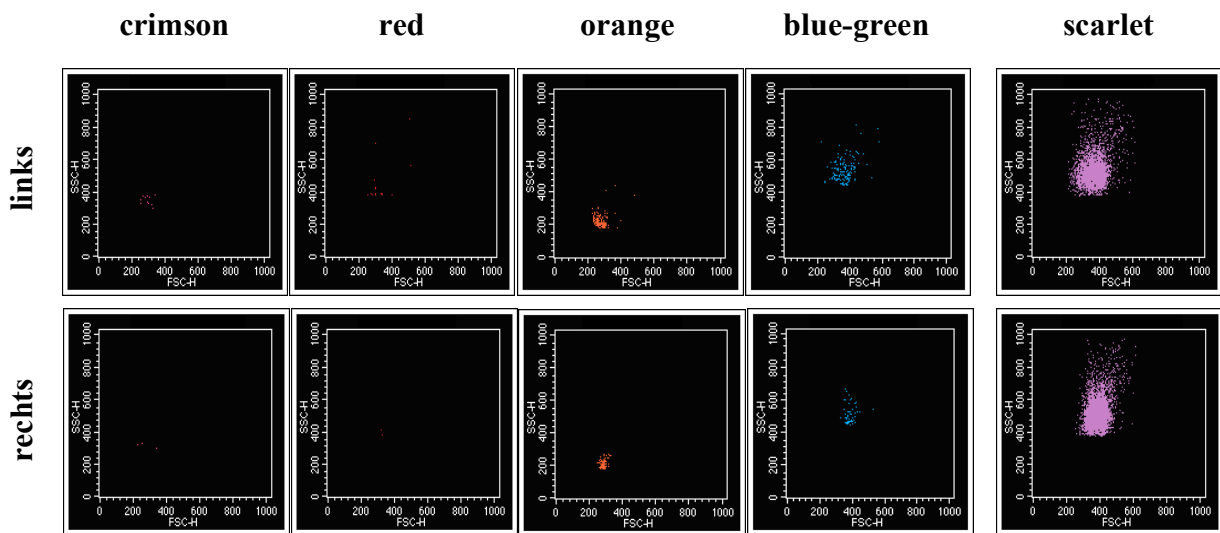
der Mikrosphären im Perfusionspuffer betrug stets 2.500/ml. Zwischen allen Farben wurde für 30 Sekunden mit reinem Perfusionspuffer gespült. Um eine Verklumpung der Mikrosphären innerhalb der Behältnisse zu verhindern, wurden diese während der gesamten Messung fortlaufend mit einem Magnetrührer durchmischt. Zu Beginn wurden bei 60 mmHg purpurfarbene Mikrosphären perfundiert (*crimson*; Absorptionsmaximum 612 nm, Emissionsmaximum 638 nm), als nächstes wurden rote Mikrosphären (*red*; Absorptionsmaximum 570 nm, Emissionsmaximum 598 nm) bei 70 mmHg, orangefarbene (*orange*; Absorptionsmaximum 534 nm, Emissionsmaximum 554 nm) bei 80 mmHg und zuletzt blaugüne Mikrosphären (*blue-green*; Absorptionsmaximum 427 nm, Emissionsmaximum 468 nm) bei 90 mmHg perfundiert. Der Perfusionsdruck konnte mit dem Druckabnehmer genau ermittelt und ggf. angepasst werden.

### **Gewebeentnahme**

Nach erfolgter Mikrosphärenperfusion wurde die Maus getötet. Da die Mikrosphären sich aufgrund ihrer Größe im Kapillarbett der distalen Hinterläufe festgesetzt hatten, wurden zur Auswertung die Unterschenkelmuskeln beidseits entnommen, gewogen und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Die Muskelproben wurden jeweils in ein 5 ml FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde jeweils 3 ml Lysepuffer hinzugefügt. Zuvor wurde der Lysepuffer mit Proteinase K (1 mg/3 ml) und scharlachroten Referenzmikrosphären (*scarlet*; Absorptionsmaximum 651 nm, Emissionsmaximum 680 nm) in der Konzentration 5000/ml versetzt. Die anschließende 7-tägige Lyse erfolgte bei 50 °C im Wasserbad. Die Proben wurden zur besseren Auflösung des Muskelgewebes täglich geschwenkt und ggf. durch kurzes Öffnen druckentlastet. Im Anschluss wurden die Proben 30 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das mikrosphärenhaltige Pellet mit 500 µl 1x PBS resuspendiert. Bei gröberer Verunreinigung, beispielsweise durch noch vorhandene Knochenreste, musste die gesamte Suspension in ein frisches FACS-Röhrchen überführt werden. Um ein Verklumpen der Mikrosphären unmittelbar vor der Messung zu verhindern, wurden alle Proben mit einem Ultraschallreiniger behandelt.

## FACS-Analyse

Die Proben wurden durchflusszytometrisch gemessen. Durch eine geeignete Einstellung der *Thresholds* und *Gates* konnten alle fünf Mikrosphärenfarben vollständig aufgespürt werden. Die vier perfundierten Farben wurden in Bezug zur Referenzfarbe und im Verhältnis rechte ligierte zur linken unligierten Seite quantitativ ausgewertet.



**Abb. 5: Beispielbild einer Mikrosphärenauswertung mittels FACS-Analyse**  
Dargestellt sind alle infundierten Mikrosphärenfarben crimson bis blue-green in aufsteigender Reihenfolge gemäß ihres Perfusionsdruckes sieben Tage nach Femoralarterienligatur. Rechts außen ist die Referenzfarbe scarlet dargestellt. Die obere Reihe repräsentiert einen linken unligierten, die untere Reihe stellt einen rechten ligierten Hinterlauf dar. Man erkennt – insbesondere an den Farben, die mit größerem Druck perfundiert wurden – eine vermehrte Anzahl an Mikrosphären im unligierten linken Bein.

### 4.5.2 Laser-Doppler-Perfusionsmessungen

Hierbei wurde mit einem Laserstrahl bei einer Wellenlänge von 830 nm das zu messende Areal systematisch angestrahlt und vollständig abgetastet. Das in den Gefäßen fließende Blut verursachte Doppler-Frequenzverschiebungen des reflektierten Laserlichtes, das von einer Kamera erfasst und zur besseren Veranschaulichung zu einer farbkodierten Karte verarbeitet wurde. Die Pixelgröße betrug 100  $\mu\text{m}$ .

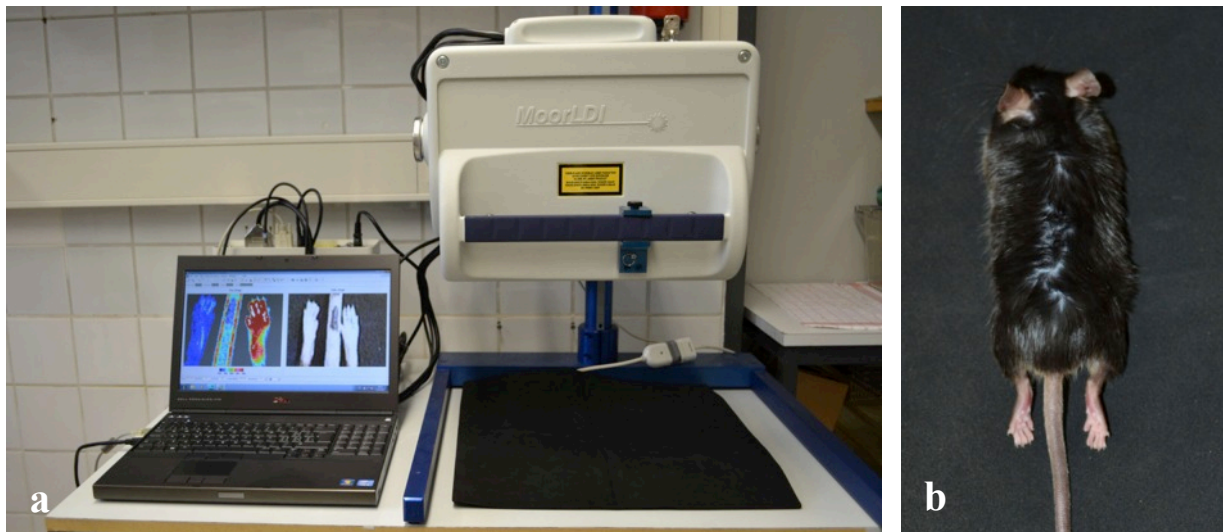
Um Bewegungsartefakte während der Messung zu minimieren, wurden die Mäuse narkotisiert und in Bauchlage mit nach kaudal gestreckten Hinterpfoten so positioniert, dass die Pfoten nebeneinander lagen und mit der Plantarseite nach oben zeigten. Die Unterlage bestand aus einer schwarzen und nicht reflektierenden Schaumstoffunterlage.

Ein Kritikpunkt der Laser-Doppler-Perfusionsmessung ist die nur geringe Eindringtiefe des Lasers von ca. 1-2 mm. Da die Pfoten allerdings dünner als die Eindringtiefe des Lasers sind, wird an dieser Stelle die gesamte distale periphere Durchblutung der Extremitäten erfasst. Ein Vorteil ergibt sich zudem aus der Messlokalisation, da die Pfoten stets unbehaart sind. Da der Laser an behaarten Hautstellen keine exakten Messungen vornehmen kann, müssten diese zunächst vollständig rasiert werden, was unmittelbar danach für einige Stunden eine Hyperämisierung der betroffenen Stellen hervorrufen und damit eine Verzerrung der Messwerte nach sich ziehen würde.

Damit bei allen Messungen die gleichen Versuchsbedingungen gewährleistet werden konnten, wurde eine konstante Raumtemperatur sichergestellt. Unter der schwarzen Unterlage befand sich ein Heizkissen, das bei jeder Messung eine konstante Temperatur von 37 °C erzeugte. Außerdem herrschten zu jeder Zeit die gleichen Lichtverhältnisse, die allerdings bei der Laser-Doppler-Messung nur eine untergeordnete Rolle spielten.

Im Vergleich zur Mikrosphärenperfusion war der entscheidende Vorteil der Laser-Doppler-Technik, dass die untersuchten Tiere nur für einen kurzen Zeitraum narkotisiert, nicht jedoch getötet werden mussten. Dadurch konnte mit diesem Verfahren ein zeitlicher Verlauf der Perfusion eines Individuums quantifiziert und dokumentiert werden, was bei terminalen Untersuchungen, wie der Mikrosphärenperfusion, nicht der Fall war.

Die Perfusion wurde vor und unmittelbar nach Femoralarterienligatur gemessen, sowie nach drei und sieben Tagen und wurde ausgedrückt im Verhältnis ligierte rechte Seite zur nicht ligierten linken Seite.



#### **Abb. 6: Laser-Doppler-Perfusionsmessung**

*An der blauen Metallhalterung ist der Laser-Doppler-Imager aufgehängt. Hinter dem Laptop befindet sich das Kontrollgerät, das den Laser-Doppler-Imager mit der Software des Computers verbindet. Unter dem Laser befindet sich eine durch ein Heizkissen angewärmte schwarze Schaumstoffunterlage, auf der die zu messende Maus gelegt wurde (a). Die Maus wurde in Bauchlage mit ausgestreckten Beinen so positioniert, dass die Plantarseite der Pfoten in Richtung Laser zeigten (b).*

### **4.6 Microfil-Angiographie**

Für die Post-mortem-Microfil-Angiographie wurde in einem terminalen Eingriff der linke Ventrikel des Herzens kanüliert und über einen Silikonkatheter unter einem konstanten Perfusionsdruck von 40 mmHg gelbe Microfil-Lösung infundiert. Um einer unterschiedlichen Gefäßweitstellung vorzubeugen, wurde wie bei der Mikrosphärenperfusion zusätzlich Adenosin infundiert, damit eine maximale Vasodilatation sichergestellt war. Die Microfil-Lösung wurde nur so lange infundiert, bis das arterielle Gefäßsystem vollständig gelb erschien. Das venöse System blieb hierbei unbetroffen. Eine Aushärtung des Microfils trat innerhalb weniger Minuten ein. Damit die gelblich hervorgehobenen Arterien besser zur Geltung kamen, wurde das umliegende Gewebe mittels Alkohol-Dehydratation und anschließender Formaldehyd-Fixierung durchsichtiger gemacht. Aufgrund der röntgendichten Eigenschaften des Microfils, konnten auch Röntgen- und computertomographische Aufnahmen der Hinterläufe angefertigt werden.

## **4.7 Immunhistochemie**

### **4.7.1 Allgemeines und Probengewinnung**

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem Proteine in einem feingeweblichen Schnitt mithilfe von Antikörpern spezifisch sichtbar gemacht werden können. In der Regel wird hierzu zunächst ein Primärantikörper eingesetzt, der spezifisch mit seinem Fab-Fragment an die Epitope der gesuchten Proteine bindet. Anschließend wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der mit seinem Fab-Fragment an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften der Sekundärantikörper können nun die gesuchten Proteine indirekt angezeigt und quantifiziert werden.

Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die entnommenen Adduktorenmuskeln unmittelbar nach Entnahme in Tissue-Tek-Einbettmedium eingebettet. Hierzu wurde ein kleines, nach oben hin offenes Gefäß aus Aluminiumfolie verwendet, in welches das Muskelgewebe unter Beibehaltung der Ausrichtung aufrecht positioniert wurde. Bei -80 °C konnte das flüssige Tissue-Tek aushärten und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Einige Stunden vor Schneiden des Gewebes wurden die Proben auf -20 °C gebracht. Mit einem Kryotom wurden nun 5 µm dünne Scheiben geschnitten, die auf einem Objektträger aufgefangen wurden. Insgesamt fanden vier verschiedene Schnitte auf einem Objektträger Platz, wobei ein Abstand von mindestens 50 µm im Gewebe zwischen den einzelnen Gewebeschnitten gewährleistet wurde, um möglichst unterschiedliche Bereiche des Muskelgewebes beurteilen zu können.

### **4.7.2 Anti-F4/80-Färbung**

Mit der Anti-F4/80-Färbung wurden Makrophagen angefärbt.

Zu Beginn wurden die Schnitte in 1x PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurden die vier einzelnen Gewebeschnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umrandet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde als nächstes eine 4 % BSA-

Blockierungslösung auf die Schnitte gegeben, die 10 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubierten. Anschließend wurde der 1:400 in Blockierlösung verdünnte Primärantikörper F4/80 auf die Schnitte gegeben, der über Nacht bei 4 °C ebenfalls in der feuchten Kammer inkubierte.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger für 2 h unverändert in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt und im Anschluss daran 3 x 5 min in 1x PBS-Tween gewaschen. Als nächstes wurde der Sekundärantikörper Biotin in einer 1:30-Verdünnung 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend wieder 3 x 5 min gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit einer 1:50 verdünnten Streptavidin-Lösung inkubiert, das an das Biotin band und selber wiederum TRITC-markiert war. Die Schnitte wurden noch ein letztes Mal gewaschen.

#### **4.7.3 Anti-iNOS-Färbung**

Mit der Anti-iNOS-Färbung wurde das in den Makrophagen befindliche iNOS angefärbt.

Für die iNOS-Färbung wurden ebenfalls die Schnitte in 1x PBS-Tween gewaschen und mit dem Fettstift umrandet. Anschließend wurden sie mit 0,5 % Igepal in PBS 2 x 5 min permeabilisiert. Es folgte eine Zugabe des 1:200 in 1x PBS verdünnten iNOS-Antikörpers, der bei 4 °C in der feuchten Kammer über Nacht inkubierte.

Vor Beginn der Weiterverarbeitung wurden die Schnitte 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 3 x 5 min in 1x PBS-Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper war ein Alexa Fluor 635-Sekundärantikörper, der mit einer 1:30-Verdünnung auf die Schnitte gegeben wurde und 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubierte. Im Anschluss daran wurden die Schnitte noch einmal gewaschen.

#### **4.7.4 Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin-Färbung**

Diese Färbung visualisierte glatte Muskelzellen der Tunica media und gab Ausdruck über die Gefäßdicke der Kollateralarterien.



Die Färbung wurde ergänzend zu den oben genannten Färbungen eingesetzt. Zunächst wurden die Schnitte mit 0,5 % Goat-Serum geblockt. Für den verwendeten Antikörper war kein Sekundärantikörper erforderlich, da er bereits selbst FITC-konjugiert war. So musste der Anti- $\alpha$ -SMC-Antikörper einmalig 1:500 verdünnt auf die Schnitte gegeben und 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert werden. Nach dem Waschen konnten die Objektträger endgültig mit Mounting Medium und DAPI eingedeckt werden.

#### **4.7.5 Anti-CD31-Färbung**

CD31 ist ein Oberflächenmarker, der von Endothelzellen exprimiert wird. Hiermit konnte festgestellt werden, ob es zu einem vermehrten Gefäßwachstum gekommen war.

Nach 10 min Waschen in 1x PBS und Umrandung der einzelnen Schnitte mit dem Fettstift, wurde der CD31-Primärantikörper 1:100 mit 1x PBS verdünnt auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Objektträger bei 4 °C in der feuchten Kammer über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde nach 10 min Waschen der Sekundärantikörper Anti-Goat IgG TRITC-konjugiert in einer 1:100-Verdünnung mit 1x PBS auf alle Schnitte gegeben, die bei 37 °C für 1 h in der feuchten Kammer inkubierten.

Anschließend konnten alle Objektträger – wie oben beschrieben – eingedeckt werden.

#### **4.7.6 Auswertung**

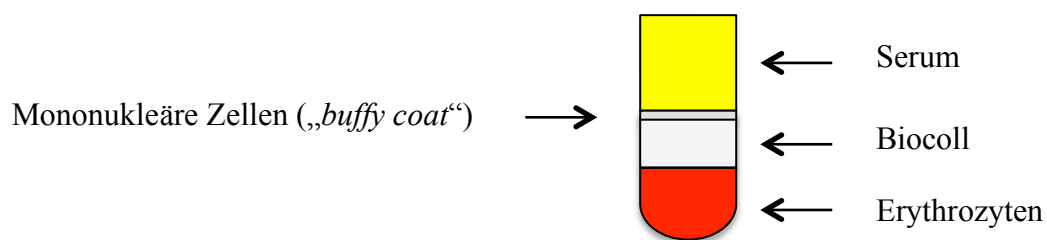
Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte automatisiert mithilfe der Computersoftware ImageJ. Es wurde sowohl die perivaskuläre Makrophagendichte als auch die durchschnittliche Gefäßwanddicke quantifiziert. Zur besseren Veranschaulichung der Kolo-kalisation von iNOS und Makrophagen wurden ausgewählte Ausschnitte mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen.

## 4.8 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR-Analyse

### 4.8.1 RNA-Isolation aus Vollblut

Für die Isolation von RNA aus Vollblut wurden die Mäuse mit einer um Heparin erweiterten Überdosis Narkose getötet, um anschließend ca. 800 µl Blut aus der V. cava inferior zu entnehmen. Die Blutentnahme erfolgte ebenfalls mit einer heparinisierten Spritze.

Nach Zentrifugation des so gewonnenen Blutes für 5 min bei 1.500 rpm, wurde das Plasma in ein frisches Reagiergefäß abpipettiert und nochmals bei 4.000 rpm 4 min zentrifugiert. Die zellreiche Phase wurde mit 1x PBS auf 3 ml aufgefüllt. Vorher wurden schon 15 ml Falcons mit 1,5 ml Biocoll vorbereitet, auf das nun das Blut/PBS-Gemisch vorsichtig geschichtet wurde, damit sich die einzelnen Phasen nicht vermischten. Anschließend wurde 20 min bei 2.400 rpm gekühlt zentrifugiert, wobei darauf zu achten war, dass zum Schluss die Zentrifuge nicht abgebremst wurde, sondern eigenständig zum Stehen kam, damit auch in diesem Schritt ein Vermischen verhindert werden konnte. Der erythrozytenfreie Überstand samt Interphase („*buffy coat*“) wurde in einen frischen 15 ml Falcon umgefüllt und mit 1x PBS auf 10 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 2.400 rpm (mit Bremse) wurde der Überstand verworfen und das nun sichtbare aus mononukleären Zellen bestehende Pellet für die RNA-Isolation verwendet, nachdem das Pellet in 300 µl Lysereagenz resuspendiert wurde.



**Abb. 7: Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll**

#### 4.8.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die spätere Extraktion der RNA aus Adduktorengewebe wurde etwa die Hälfte des unilateralen M. adductor magnus, bzw. etwa ein Drittel der Milz entnommen und mit 700 µl Lysepuffer (PeqGold) in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und homogenisiert. Nachdem das Gewebe vollständig homogenisiert war, wurden weitere 300 µl Lysereagenz hinzugegeben. Hierbei war es wichtig, darauf zu achten, dass das Gewebe durch das Homogenisieren nicht überhitzte. Gegebenenfalls musste für kurze Zeit pausiert werden, um ein Abkühlen der Probe zu ermöglichen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und sehr gründlich durchmischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Homogenat 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen bildeten. Von der oberen wässrigen Phase wurden 500 µl in ein neues Reagenzgefäß abpipettiert und mit derselben Menge an Isopropanol 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch für 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Isopropanol abgesaugt und mit 1 ml 70 % Ethanol zum Waschen 20 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Auch das Ethanol wurde wieder vollständig abgesaugt. Das verbliebene aus RNA bestehende Pellet wurde bei RT ca. 1 h getrocknet und anschließend mit 30 µl DNase-free H<sub>2</sub>O resuspendiert und 10 min bei 60 °C inkubiert. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C weggefroren.

#### 4.8.3 Erstellung der cDNA

Die Umschreibung der so gewonnenen RNA wurde mithilfe des „*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*“ durchgeführt. Zuvor wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm die RNA-Konzentration aller Proben ermittelt. Nach Konzentrationsangleichung der unterschiedlichen Proben konnte die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

Hierfür wurden 2 µg der cDNA mittels Injektionswasser auf 10 µl Gesamtvolumen erweitert und ebenso mit 10 µl *Master-Mix* erweitert. Der *Master-Mix* bestand aus 2 µl 10x *RT Buffer*, 0,8 µl 25x *dNTP Mix* (100 mM), 2 µl 10x *RT Random Primers*, 1 µl *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1 µl *RNase Inhibitor* und 3,2 µl *Nuclease-free H<sub>2</sub>O*.

Für die eigentliche reverse Transkription wurden die Proben im *Thermocycler* zunächst für 10 min auf 25 °C erwärmt, anschließend 120 min bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurden für 5 min bei 85 °C die Enzyme inaktiviert. Bis zur weiteren Verarbeitung in der *Real-Time-PCR* wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.8.4 Amplifikation der cDNA

Die PCR ist ein In-vitro-Verfahren, das den Nachweis geringer Mengen DNA durch enzymatische Amplifikation ermöglicht. Hierzu werden zwei spezifische Oligonukleotidsequenzen als Primer im Überschuss zu der zu vervielfältigenden DNA, der sogenannten *Template-DNA*, hinzugegeben. Diese Primer binden an die *Template-DNA* und bilden gegenläufig den komplementären DNA-Strang. Die *Template-DNA* dient in diesem Fall als Matrize für die Primer.

Die PCR besteht aus drei zyklischen Abfolgen von Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Bei der Denaturierung wird die DNA auf 95 °C erhitzt, damit sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren lösen und somit die Trennung der doppelsträngigen DNA ermöglichen. Im nächsten Schritt, dem *Annealing*, kommt es bei 60 °C zur Anlagerung der beiden Primer an die Matrize. Die durch Primer begonnenen komplementären DNA-Stränge werden im letzten Schritt, der Elongation, bei 72 °C vervollständigt. Das Ergebnis ist eine Verdopplung der Anfangs-DNA-Menge. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt, um eine aussagekräftige Menge an DNA zu erhalten.

Für die Auswertung der qRT-PCR mithilfe einer relativen Standardreihe wurde eine Mischung aller zu messender Proben erstellt. Diese wurde in fünf absteigenden 1:2-Verdünnungen, beginnend bei einer 1:10-Verdünnung (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) auf die *96-Well-Plate* pipettiert. Es wurden jeweils 3 µl der cDNA-Suspension verwendet. Im Anschluss an die Standardreihe wurde eine Negativkontrolle mitgemessen. In diese wurde keine cDNA hinzugegeben.

Das *Housekeeper*-Gen 18S wurde aufgrund einer starken ubiquitären Expression stärker verdünnt, nämlich in 1:10-Verdünnungsschritten (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000).

Anschließend wurden alle zu messenden Proben nacheinander in Doppelbestimmung auf die *96-Well-Plate* pipettiert. In alle *Wells* wurden 17 µl Master-Mix hinzugefügt. Der Master-Mix bestand jeweils aus 7 µm SYBR-Green-Reagenz, je 0,5 µl *forward* und *reverse Primer* und 9 µl *Nuclease-free H<sub>2</sub>O*.

Vor Beginn der Messung wurde die *96-Well-Plate* 3 min bei 500 g zentrifugiert, um sicherzustellen, dass keine Luftblasen in den Proben vorkamen und dass sich die cDNA auf dem Boden der *Wells* befand, um eine problemlose Messung zu ermöglichen.

Zudem wurde nach jeder Elongations-Phase eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Proben kontinuierlich erhitzt, um eine Denaturierung der bereits entstandenen cDNA-Doppelstränge zu bewirken. Durch diese Reaktion wurde der zuvor in die Doppelstränge eingebaute Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green freigesetzt. Die Stärke der Fluoreszenz war proportional zu den bereits erstellten cDNA-Strängen.

Die erhaltenen Werte jeder Messung wurden im Verhältnis zu den *Housekeeper*-Genen 18S und HPRT ausgewertet. Die *Housekeeper*-Gene sind Referenz-Gene und werden von jeder Zelle in ähnlicher Kopienzahl exprimiert, wobei 18S in größeren Mengen vorhanden ist.

## 4.9 NOSdetect Assay Kit

Das *NOSdetect Assay Kit* ist ein Verfahren, mit dem die NOS-Aktivität (unspezifisch für eNOS, iNOS oder nNOS) mittels Radioaktivität gemessen wird. Die Messung basiert auf der NOS-katalysierten Reaktion von Arginin zu Citrullin, bei der NO freigesetzt wird.

Es wurden dieselben Proben verwendet, wie für die RNA-Isolation.

Radioaktives [<sup>3</sup>H]-Arginin wurde der Probe hinzugegeben. Nach kurzer Inkubation wurde die Reaktion mit EDTA gestoppt. Anschließend wurde Resin hinzugegeben, welches das Arginin bindet. Aufgrund der unterschiedlichen Ladungen von Arginin und Citrullin bei pH 5,5 konnten beide Substanzen voneinander getrennt werden. Die NOS-Aktivität konnte nun im Citrullin-Überstand gemessen werden.

## 4.10 Statistik

Alle Daten wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Innerhalb einer Gruppe wurden zwei Messwerte mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test betrachtet, Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels ungepaartem T-Test durchgeführt. Verschiedene Werte im zeitlichen Verlauf wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Post-hoc-Test verglichen. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistische Analysen wurden mit SPSS 20.0.0 berechnet. Die graphischen Abbildungen der Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism erstellt.

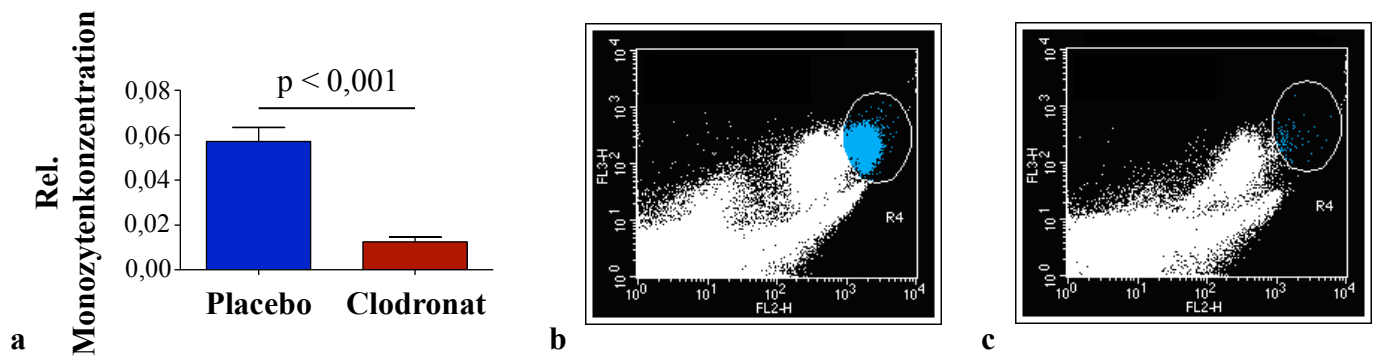
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung und Wirkung der Clodronat-Behandlung

Die Liposomen konnten sowohl intravenös (i.v.) als auch intraperitoneal (i.p.) injiziert werden. Ein Vorteil der i.p.-Injektionen stellte die einfache Anwendung dar, da die Injektion selbst weniger invasiv war und nicht in Narkose durchgeführt werden musste. Der entscheidende Nachteil lag jedoch darin, dass nur eine geringe Kontrolle über die tatsächlich systemisch wirksame Liposomen-Dosis möglich war. Bei häufigeren Injektionen – wie sie in diesem Experiment durchgeführt worden waren – und hohen Dosen der Liposomen konnte eine vollständige Aufnahme der Suspension durch das Peritoneum nicht mehr gewährleistet werden. Bemerkbar machte sich dieses Problem, als bei der Laparotomie für die Blut- und Organentnahme noch ein großer Anteil der milchig-weißen Liposomenflüssigkeit im Bauchraum der Maus zu finden war. Für die Versuche wurde letztendlich die verlässlichere i.v.-Injektion in den retrobulbären Venenplexus gewählt.

#### 5.1.1 Clodronat vermindert die Monozytenpopulation im peripheren Blut nach 24 h

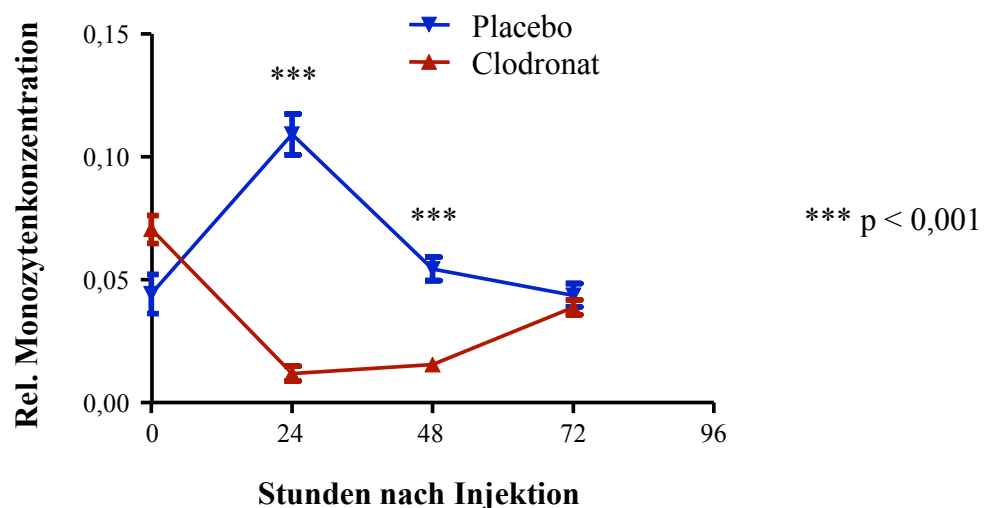
Die Durchflusszytometrie wurde dazu benutzt, die Wirkung der Clodronat-Liposomen auf die Monozytenpopulation im Blut zu untersuchen. Nach einmaliger i.v.-Injektion von 100 µl Clodronat-Liposomen kam es nach 24 h Stunden zu einem signifikanten Abfall der Monozytenkonzentration im peripheren Blut auf  $22,0 \pm 3,0 \%$  ( $p < 0,001$ ) der mit Placebo behandelten Tiere. Die relative Monozytenkonzentration wurde ausgedrückt in Anzahl gemessener Monozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten der jeweiligen Probe.



**Abb. 8: Abnahme der Monozytenpopulation im Blut nach 24 h**  
 Graphische Darstellung der relativen Monozytenkonzentration (a). Durchflusszytometrische Messung der Placebo-Gruppe (b), bzw. der Clodronat-Gruppe (c). Zu b und c: Die Achsen stellen in logarithmischer Form das Fluoreszenzausmaß zweier angefärbter Oberflächenantigene der gemessenen Zellen dar (X-Achse: CD11b, Y-Achse: CD115). Da Monozyten beide Antigene exprimieren, sind sie in beiden Achsen am stärksten ausgeprägt. (n=6-7)

### 5.1.2 Verlauf der Monozytenkonzentration im Blut

Nach einer einmaligen Injektion von 100  $\mu$ l Clodronat-Liposomen (bzw. Placebo-Liposomen) sinkt zunächst wie erwartet die Monozytenkonzentration nach 24 h Stunden in der Clodronat-Gruppe ab. Bei der Placebo-Gruppe kommt es innerhalb derselben Zeit zu einem Anstieg, möglicherweise als Reaktion auf den inflammatorischen Reiz der retrobulbären i.v.-Injektion.



**Abb. 9: Verlauf der Monozytenkonzentration im Blut innerhalb von 72 h nach Clodronat-Injektion**

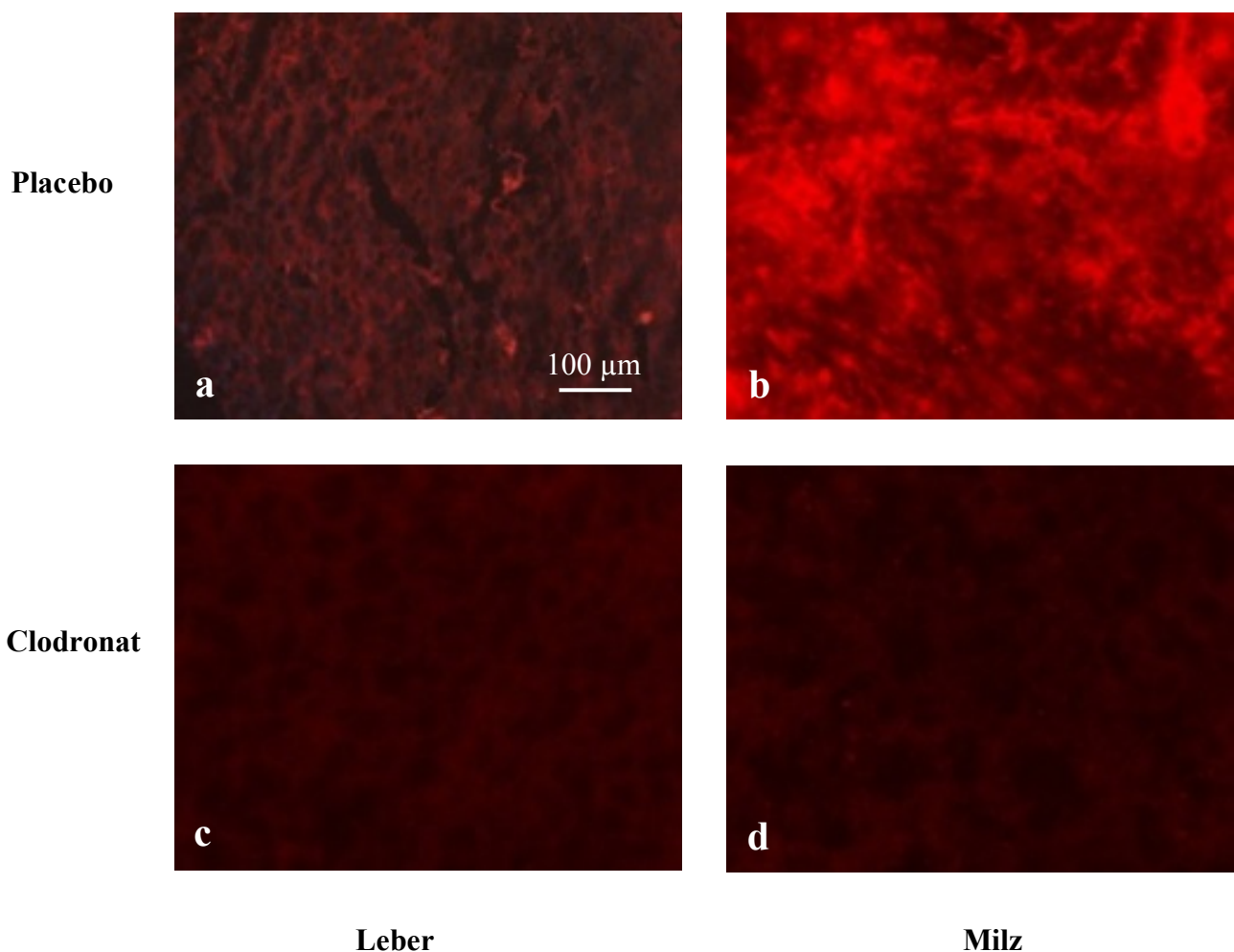
Aufgezeigt wird die Monozytenkonzentration relativ zur Gesamtleukozytenzahl im Blut im zeitlichen Verlauf nach einer einmaligen Injektion der Liposomen (100  $\mu$ l i.v.). (n=4-6)



Ab dem zweiten Tag nach Injektion normalisieren sich beide Gruppen wieder und nähern sich ihrem Ursprungswert an, den sie nach etwa drei Tagen erreichen.

### 5.1.3 Clodronat verringert die Makrophagendichte in Leber und Milz nach 48 h

Um die systemische Depletion der Makrophagen (rot in Abb. 10) durch Clodronat zu untersuchen, wurden 48 h nach Liposomen-Injektion Leber und Milz entnommen und mit der Anti-F4/80-Färbung immunhistochemisch angefärbt.



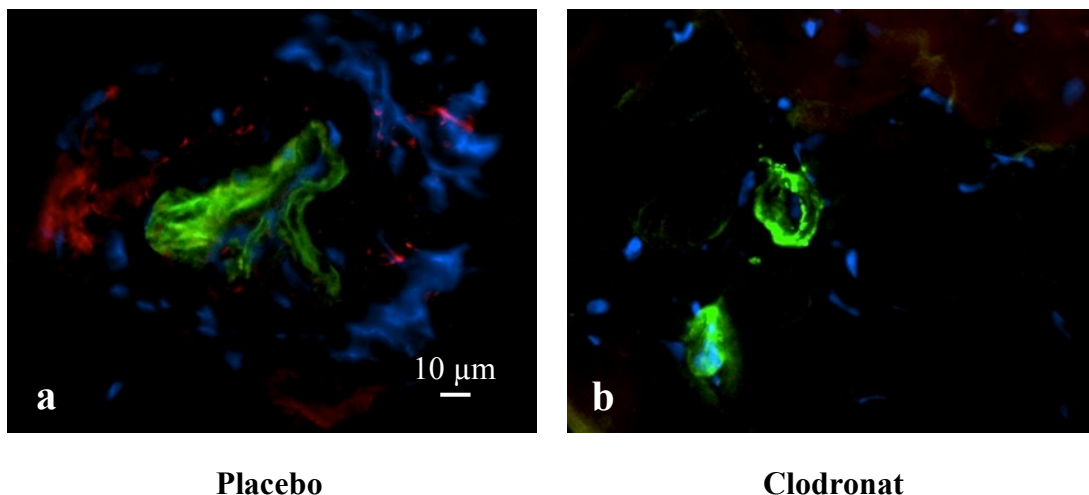
**Abb. 10: Darstellung der Makrophagendepletion durch Clodronat-Behandlung in Leber und Milz 48 h nach Injektion**

Man erkennt bei den mit Placebo behandelten Tieren eine deutliche Makrophagenreduktion. Da in der Milz – als Teil des retikuloendothelialen Systems – naturgemäß eine höhere Anzahl

Makrophagen vorhanden ist, kann auch hier die ausgeprägtere Depletion festgestellt werden ( $4,1 \pm 0,2 \%$  ( $p = 0,004$ ) im Vergleich zur mit Placebo behandelten Gruppe).

#### 5.1.4 Clodronat reduziert die Anzahl perivaskulärer Makrophagen im M. adductor magnus

In der vorliegenden Versuchsreihe sollte der Einfluss von Monozyten und Makrophagen auf die Arteriogenese untersucht werden. Daher war es wichtig zu wissen, ob die Clodronat-Liposomen auch eine Depletion dieser Zellen im M. adductor magnus, in dem sich ein Großteil der Kollateralarterien befinden, hervorrufen konnte.



**Abb. 11: Einfluss von Clodronat auf perivaskuläre Makrophagen im Hinterlauf**  
*Histologischer Schnitt eines rechten M. adductor magnus sieben Tage nach ipsilateraler Femoralarterienligatur. Nach Placebo-Behandlung sind einige perivaskuläre Gewebemakrophagen erkennbar, die unter Clodronat-Behandlung nicht nachweisbar sind. Blau (DAPI): Zellkerne, grün ( $\alpha$ -smooth muscle actin): Kollateralarterie, rot (Anti-F4/80): Makrophagen.*

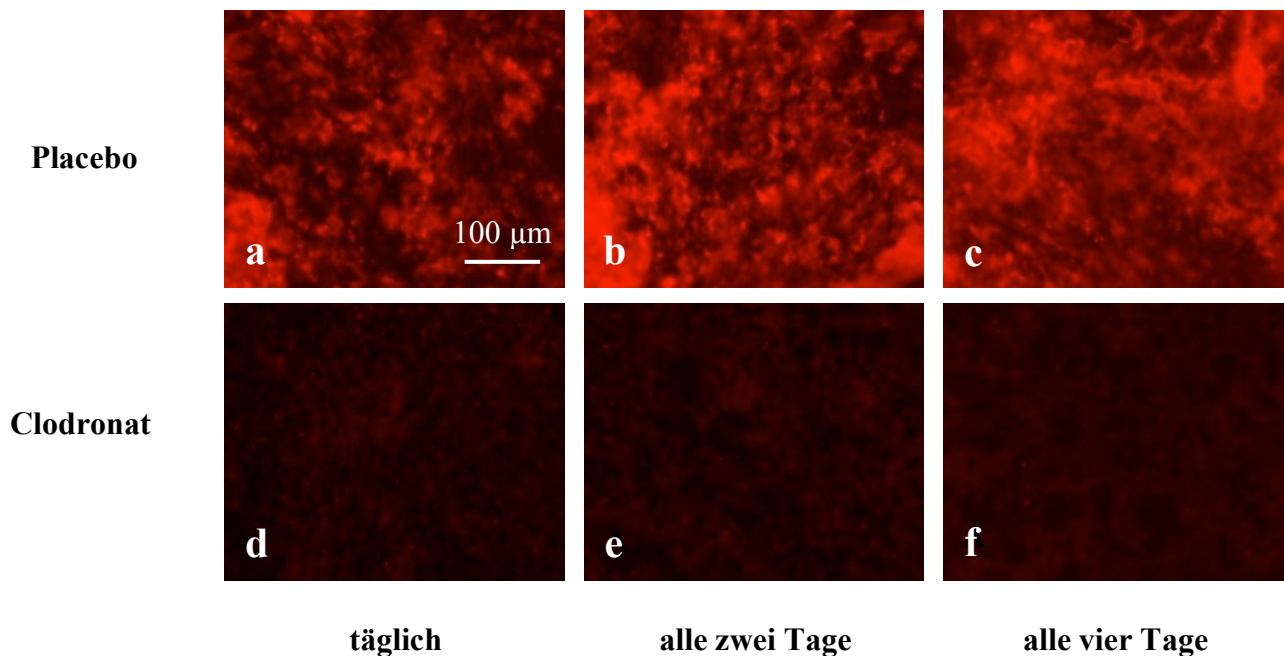
Es ist eine deutliche Verminderung der perivaskulären Makrophagen (rot) nach Clodronat-Behandlung zu erkennen (s. auch 5.3.1).

Die Makrophagendepletion im Gewebe (sowohl Muskel als auch Leber und Milz) unterlag im Gegensatz zur Monozytendepletion im Blut keinen Schwankungen. Eine einmalig

hervorgerufene systemische Monozyten- bzw. Makrophagendepletion konnte durch eine regelmäßige Clodronat-Behandlung aufrechterhalten werden.

### 5.1.5 Vergleich verschiedener Injektionsschemata

Um das benötigte Injektionsschema herauszufinden, wurden verschiedene Konzentrationen mit unterschiedlichen Injektionsfrequenzen miteinander verglichen. Verglichen wurde eine Gruppe, bei der täglich 100 µl Liposomen injiziert und jeweils eine Gruppe, bei der alle zwei bzw. alle vier Tage 200 µl injiziert wurden. Zur Auswertung wurden histologische Schnitte von Milzgewebe angefertigt und mit Anti-F4/80 angefärbt. Die Ergebnisse zeigten sowohl in der Placebo-Gruppe als auch in der Clodronat-Gruppe untereinander keine signifikanten Unterschiede, insgesamt jedoch eine gleiche Abnahme der Makrophagenpopulation bei den mit Clodronat behandelten Tieren. Die Stärke der Makrophagendepletion ist folglich ausreichend bei einer weniger häufigen Injektionsfrequenz. Dieses Ergebnis bestätigte die bereits durchflusszytometrisch gewonnenen Erkenntnisse.



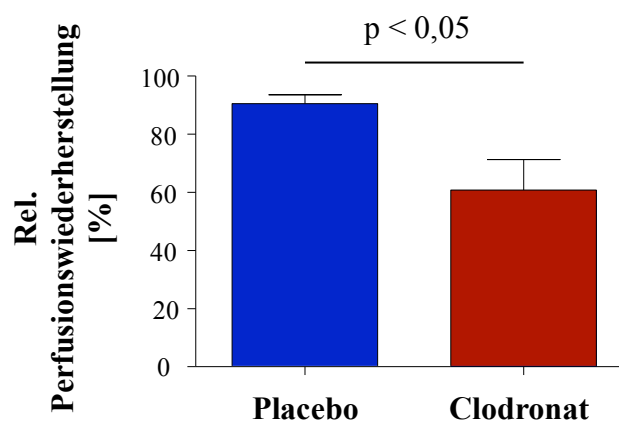
**Abb. 12: Verlauf der Monozytenkonzentration innerhalb von 48 h nach unterschiedlichen Injektionsfrequenzen in der Milz**

### 5.1.6 Einfluss von Clodronat auf die Hinterlaufperfusion

Der Einfluss von Clodronat auf die Hinterlaufperfusion wurde mit der Mikrosphärentechnik gemessen. Hierzu wurden die Mäuse einer Femoralarterienligatur unterzogen. Die Perfusionsmessung fand sieben Tage nach Ligatur statt.

Die bis hierhin ermittelte Clodronat-Behandlung war an unbehandelten und nicht voroperierten Mäusen angewendet worden. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Schema zur systemischen Langzeitdepletion von Monozyten etabliert worden war, wurde die Clodronat-Konzentration für den stark inflammatorischen Reiz der Femoralarterienligatur probeweise erhöht. Die zunächst getestete Konzentration betrug: 100 µl i.v. an folgenden Tagen (wobei Tag 0 den Zeitpunkt der Ligatur darstellt): -1, 0, 1, 2, 6. Insgesamt erhielten die Mäuse somit 500 µl Clodronat, was einer Gesamtmenge von 2,5 mg Clodronat pro Versuchstier entsprach.

Die Ergebnisse der Mikrosphärenperfusion sind in Abb. 13 dargestellt.



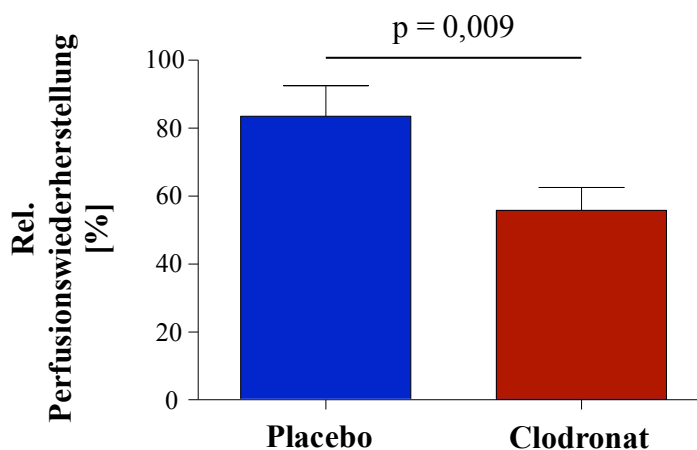
**Abb. 13: Relative Perfusionswiederherstellung sieben Tage nach Femoralarterienligatur**  
*n=6*

Die Perfusionswiederherstellung wurde durch Clodronat erfolgreich inhibiert. Die Perfusion im ligierten Bein der Clodronat-Gruppe war nach einer Woche erst bei  $60,8 \pm 10,5$  % des linken unligierten Beines, während die Placebo-Gruppe sich schon auf  $88,3 \pm 2,9$  % erholt hatte ( $p < 0,05$ ).

Auch wenn die Clodronat-Konzentration ausreichend für eine Inhibierung der Perfusionswiederherstellung war, führte die hohe verabreichte Dosis zu erheblichen Nebenwirkungen. Nach Laparotomie wurde deutlich, dass einige der mit Clodronat behandelten Tiere einen weißen Thrombus in der V. cava inferior aufwiesen, der möglicherweise eine Verklumpung der Liposomen darstellen könnte. Außerdem war die Milz makroskopisch sichtbar dunkel verfärbt und der Magen weiß belegt. Insgesamt kam es in der Clodronat-Gruppe auch zu einem Körpergewichtsverlust. Nicht zuletzt fiel eine erhöhte Mortalität in der mit Clodronat behandelten Gruppe auf.

Als Konsequenz daraus wurde die Clodronat-Konzentration gesenkt. Das nun angewandte Injektionsschema wurde auf -1, 1, 4 festgelegt. Dies entspricht einem Clodronat-Volumen von 300 µl (entspricht 1,5 mg, also einer Dosisreduktion auf 60 % des ersten Versuches).

Die Versuchsbedingungen sind abgesehen von der reduzierten Clodronat-Dosis unverändert. Das Ergebnis der zweiten Mikrosphärenperfusionsmessung ist in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14: Relative Perfusionswiederherstellung sieben Tage nach Ligatur bei verringerter Clodronat-Konzentration ( $n=6$ )**

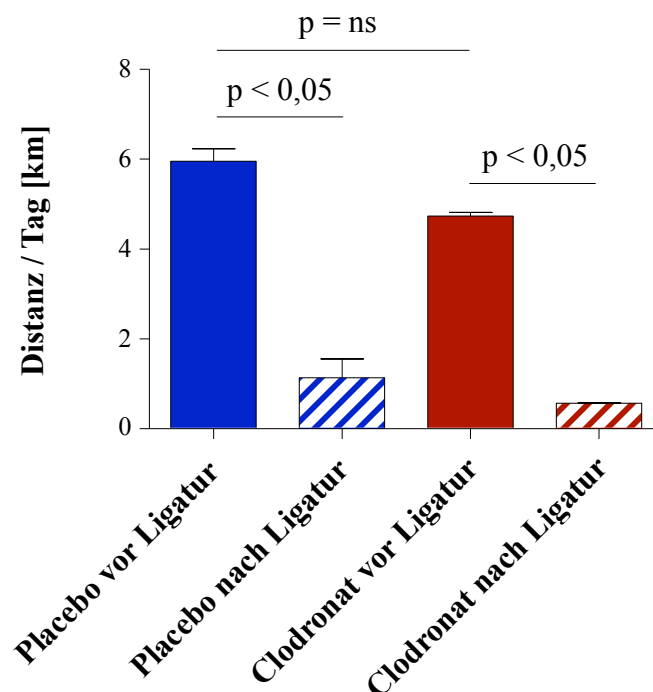
Das Perfusionsergebnis war vergleichbar mit dem des ersten Versuches. Die Clodronat-Gruppe wies nach sieben Tagen auch hier nur eine Perfusion im rechten Bein von  $55,8 \pm 6,7$  % im Vergleich zum linken Bein auf, während die Placebo-Gruppe bereits bei  $83,5 \pm 9,0$  % ( $p = 0,009$ ) lag.

Die Nebenwirkungen waren in diesem Versuch deutlich geringer ausgeprägt, was sich in der Verminderung von Gewichtsverlust und Todesrate widerspiegelte.

Diese Daten zeigen, dass eine systemische Monozyten- und Makrophagendepletion die Perfusionswiederherstellung im ligierten Bein verlangsamt und bestätigen auch die anfangs bereits durchflusszytometrisch und histologisch vermuteten Ergebnisse, dass eine erhöhte Clodronat-Konzentration keine Vorteile für die Makrophagendepletion erbringt.

## 5.2 Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf die Hinterlaufperfusion

Die durchschnittliche Laufdistanz betrug bei den mit Placebo behandelten Tieren  $5,5 \pm 1,0$  km und bei den mit Clodronat behandelten Tieren  $4,6 \pm 0,6$  km. Es gab keine signifikanten Unterschiede der Laufdistanzen zwischen den beiden Gruppen vor Femoralarterienligatur. Nach Ligatur sank die Laufdistanz bei Placebo auf  $0,9 \pm 0,4$  km und bei Clodronat auf  $0,6 \pm 0,1$  km. Der bedeutendere Anteil des Ausdauertrainings erfolgte somit vor der Femoralarterienligatur. Das Ausdauertraining erfolgte freiwillig und fand bevorzugt nachts statt.

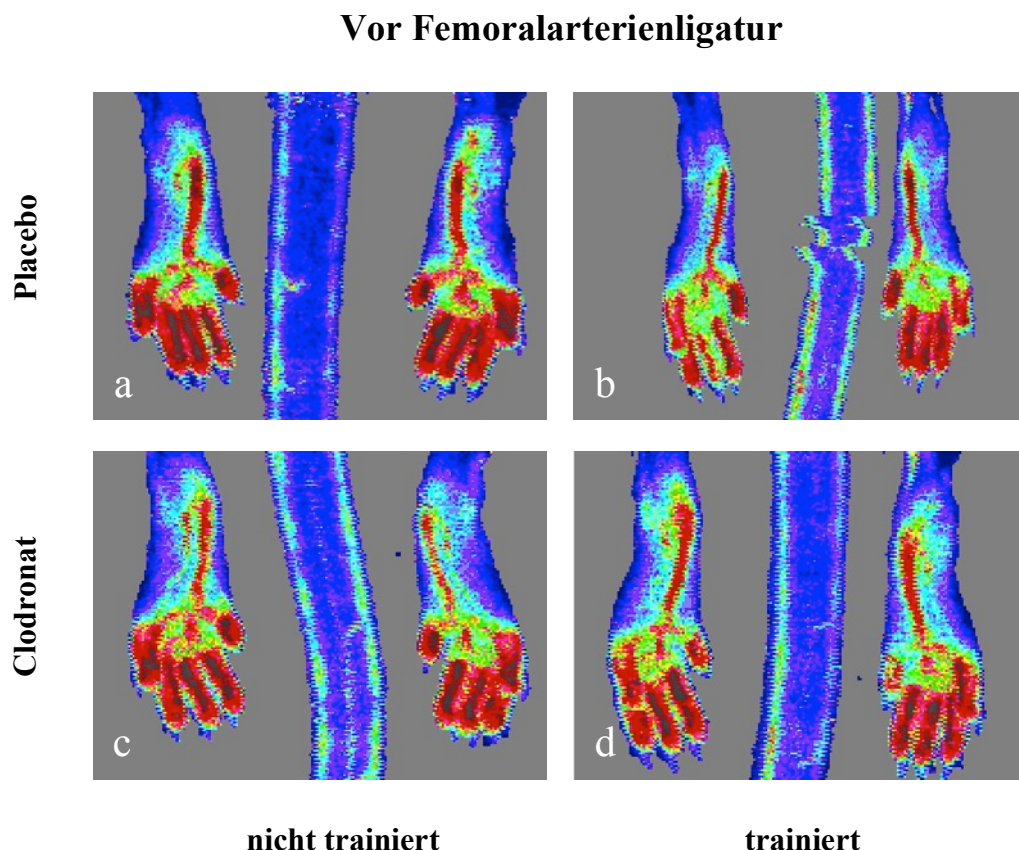


**Abb. 15: Laufdistanzen vor und nach Femoralarterienligatur**

Die täglichen Laufdistanzen vor Femoralarterienligatur waren bei beiden Gruppen gleich. Nach Ligatur kam es zu einem starken Abfall der Laufstrecke. (n=8)

Die Perfusionsmessung des Hinterlaufes wurde sowohl unmittelbar vor und nach Femoralarterienligatur durchgeführt als auch drei bzw. sieben Tage danach. Die Abbildungen zeigen jeweils beide Pfoten einer Maus. Um eine möglichst vollständige Messung der Extremitäten-Perfusion zu gewährleisten, wurde die unbehaarte Plantarseite der Pfoten gemessen. Die Maus lag dafür bei der Messung auf dem Bauch. In jedem Bild ist zwischen beiden Pfoten ein Teil des Schwanzes zu erkennen, der lagerungstechnisch mit abgebildet, jedoch bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Die Änderung der Perfusion des rechten ligierten Beines wurde jeweils relativ zur unligierten linken Seite dargestellt, die definitionsgemäß 100 % betrug.

### 5.2.1 Ausdauertraining ohne Femoralarterienligatur verändert die Hinterlaufperfusion nicht



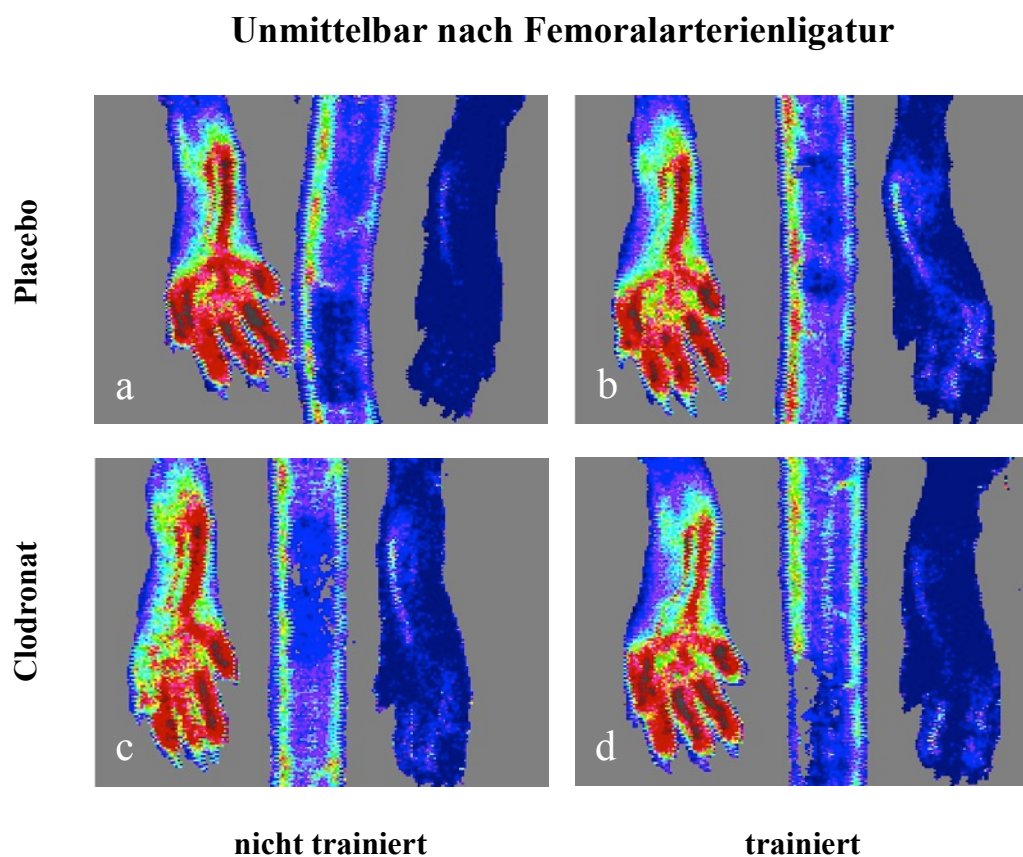
**Abb. 16: Laser-Doppler-Perfusionsmessung unmittelbar vor Femoralarterienligatur**  
 Zu sehen sind jeweils beide Pfoten mit der Plantarseite nach oben und ein Teil des Schwanzes in der Mitte. Das Ausmaß der Perfusion ist farbkodiert dargestellt, wobei rot für eine ausgeprägte und blau für eine schwache Perfusion steht. Der graue Hintergrund wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.



Nach einer dreiwöchigen Trainingsphase mit regelmäßigen Clodronat-Injektionen konnte kein signifikanter Unterschied in der Hinterlaufperfusion zwischen allen vier Gruppen festgestellt werden, unabhängig von der Art des Trainingsstatus bzw. der Behandlung. Diese Beobachtung zeigt, dass Ausdauertraining für sich keine funktionellen Veränderungen an den Gefäßen hervorruft.

Nach Femoralarterienligatur kam es in allen vier Behandlungsgruppen zu einer Abnahme der Perfusion im ligierten Bein. Die Perfusion sank auf  $9 \pm 1$  % in der nicht trainierten Placebo-Gruppe und auf  $10 \pm 1$  % in der trainierten Placebo-Gruppe ( $p = \text{ns}$ ).

Auch hier erkennt man, dass es zu diesem Zeitpunkt noch zu keiner Arteriogenese gekommen war. Dadurch war ein gemeinsamer Startpunkt für den Beginn der Perfusionswiederherstellung gewährleistet.

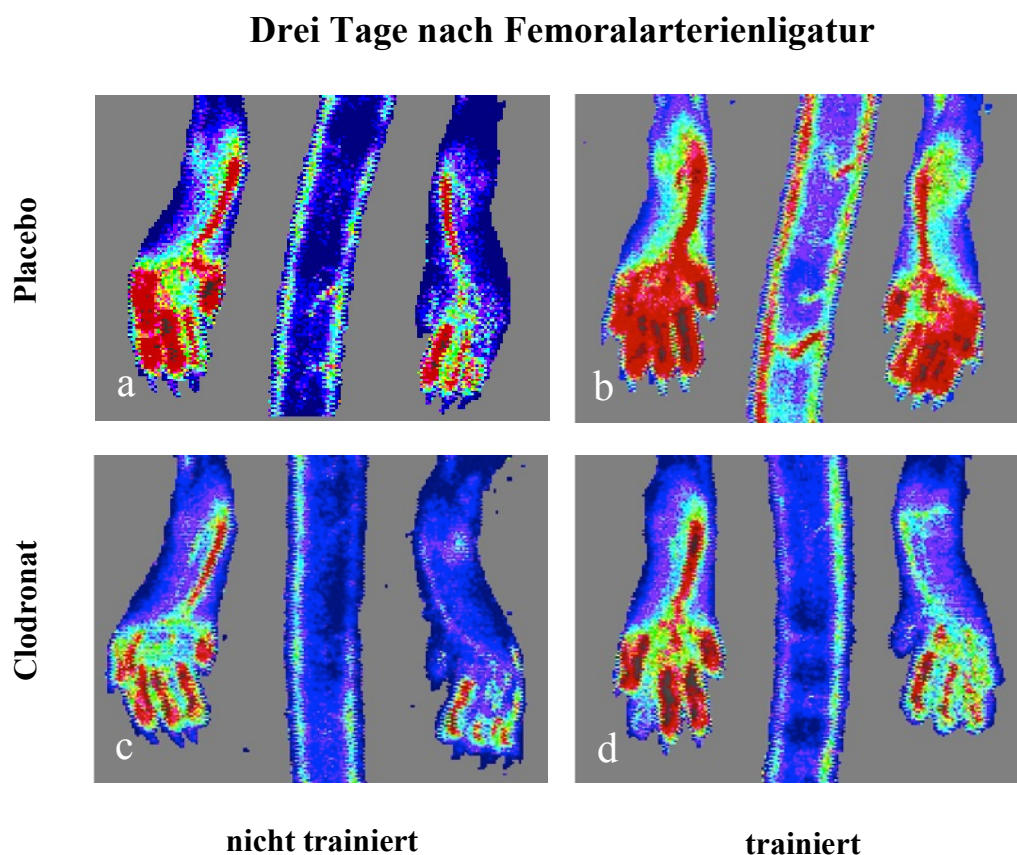


**Abb. 17: Laser-Doppler-Perfusionsmessung unmittelbar nach Femoralarterienligatur**



### 5.2.2 Ausdauertraining beschleunigt die Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur, die durch Clodronat inhibiert wird

Bereits drei Tage nach Femoralarterienligatur wurde eine Veränderung der Extremitäten-Perfusion erkennbar, die sich nach sieben Tagen weiter fortsetzte. In der mit Placebo behandelten und trainierten Gruppe (Abb. 18b und 19b) erholte sich die Durchblutung rascher als in den anderen drei Gruppen. Nach drei Tagen war die Perfusion im rechten, ligierten Bein bereits auf  $59 \pm 9 \%$  und nach sieben Tagen auf  $73 \pm 8 \%$  des nicht ligierten linken Beines angestiegen.

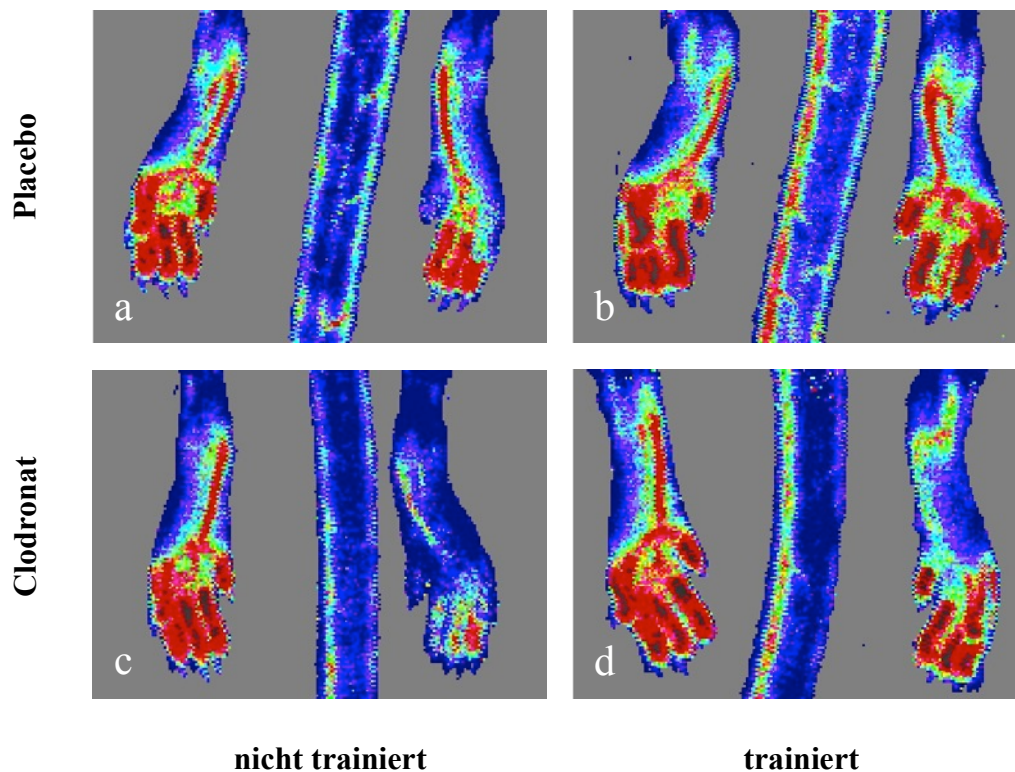


**Abb. 18: Laser-Doppler-Perfusionsmessung drei Tage nach Femoralarterienligatur**

Die ausdauertrainierte und mit Placebo behandelte Gruppe hatte mit  $73 \pm 8 \%$  die nach sieben Tagen stärkste Perfusionswiederherstellung der vier Gruppen erfahren. Am schwächsten war diese bei der nicht trainierten und mit Clodronat behandelten Gruppe.

Tatsächlich war auch nach sieben Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Clodronat behandelten Gruppen (trainiert  $51 \pm 7 \%$ , nicht trainiert  $33 \pm 5 \%$ ) und der nicht trainierten Placebo-Gruppe ( $48 \pm 7 \%$ ) zu messen.

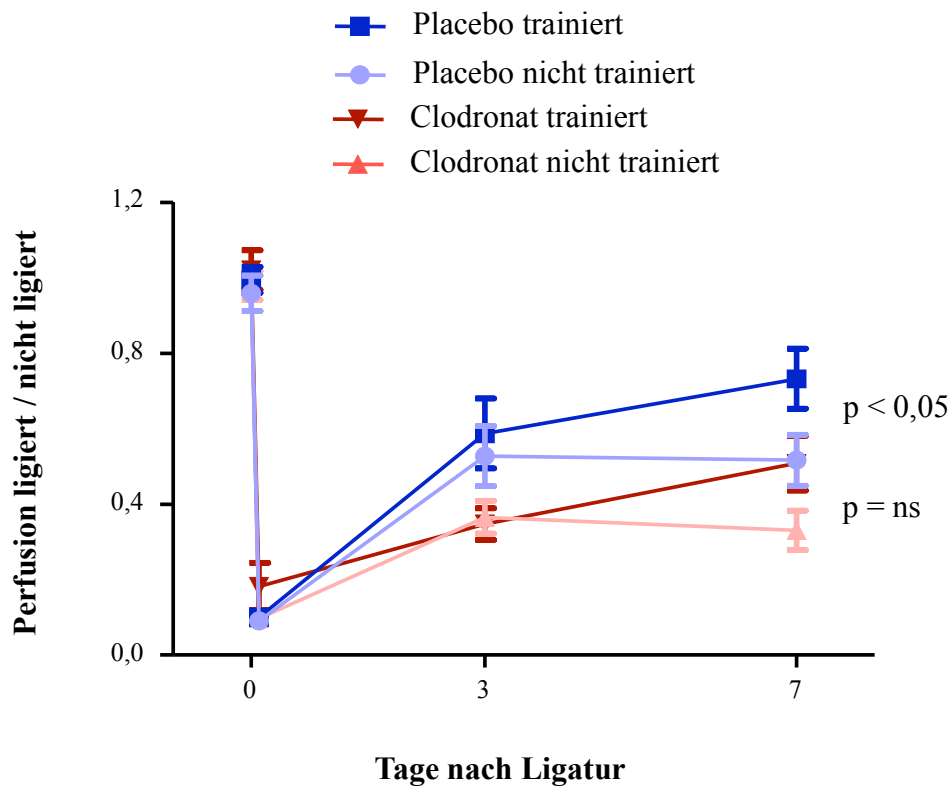
### Sieben Tage nach Femoralarterienligatur



**Abb. 19: Laser-Doppler-Perfusionsmessung sieben Tage nach Femoralarterienligatur**

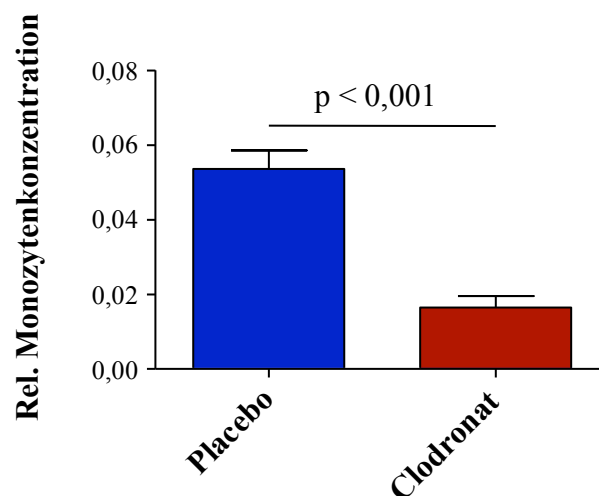
Diese Beobachtungen zeigen, dass Ausdauertraining das Kollateralarterienwachstum fördert, eine systemische Monozytendepletion mit Clodronat-Liposomen dieses hingegen inhibiert.

In Abb. 20 sind alle Laser-Doppler-Perfusionsmessungen im zeitlichen Verlauf zusammengefasst.



**Abb. 20: Laser-Doppler-Perfusionsmessungen im zeitlichen Verlauf**  
( $n=4-11$ )

Kurz vor der Femoralarterienligatur wurde erneut Blut entnommen, um die Monozytenkonzentration zu ermitteln. Eine Clodronat-Injektion hatte zuletzt 24 h vor der Ligatur stattgefunden. Hieraus ging eine signifikant niedrigere Monozytenzahl im Blut bei der mit Clodronat behandelten Gruppe hervor.



**Abb. 21: Relative Monozytenkonzentration unmittelbar vor Femoralarterienligatur**  
( $n=4-6$ )

## 5.3 Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf die Kollateralarterien im Hinterlauf

### 5.3.1 Ausdauertraining erhöht die Anzahl perivaskulärer Makrophagen und die Media-Dicke der Kollateralarterien

Ausdauertraining erhöhte sieben Tage nach Femoralarterienligatur die Anti-F4/80-positive Fläche um die Gefäße in der Adduktorenmuskulatur, was eine verstärkte Akkumulation von Makrophagen um Kollateralarterien aufzeigte. Die Fläche der perivaskulären Makrophagen (rot in Abb. 23) verdoppelte sich in ausdauertrainierten Mäusen von  $98,0 \pm 14,3 \mu\text{m}^2$  (nicht trainiert) auf  $195,0 \pm 17,6 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$ ). Ähnlich verhielt es sich bei der Clodronat-Gruppe; hier konnte die Makrophagenfläche der nicht trainierten Tiere von dem  $0,3 \pm 0,0$ -fachen durch Ausdauertraining auf das  $0,4 \pm 0,1$ -fache ( $p = 0,027$ ) gesteigert werden.

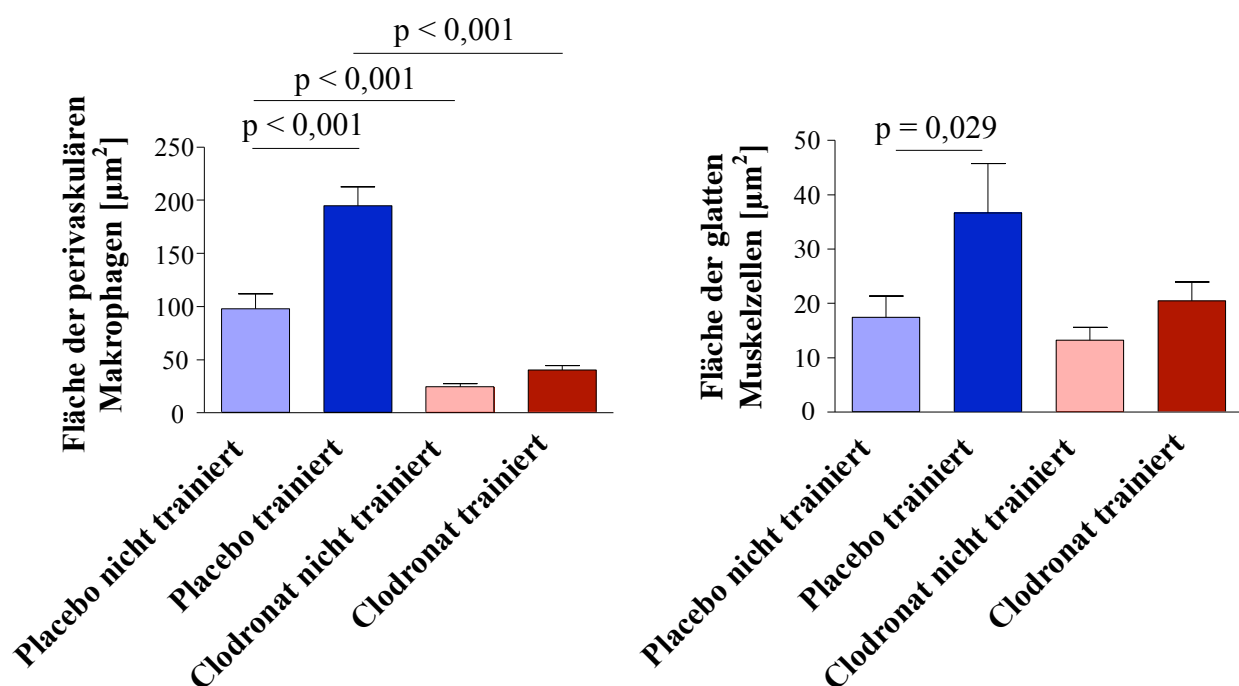
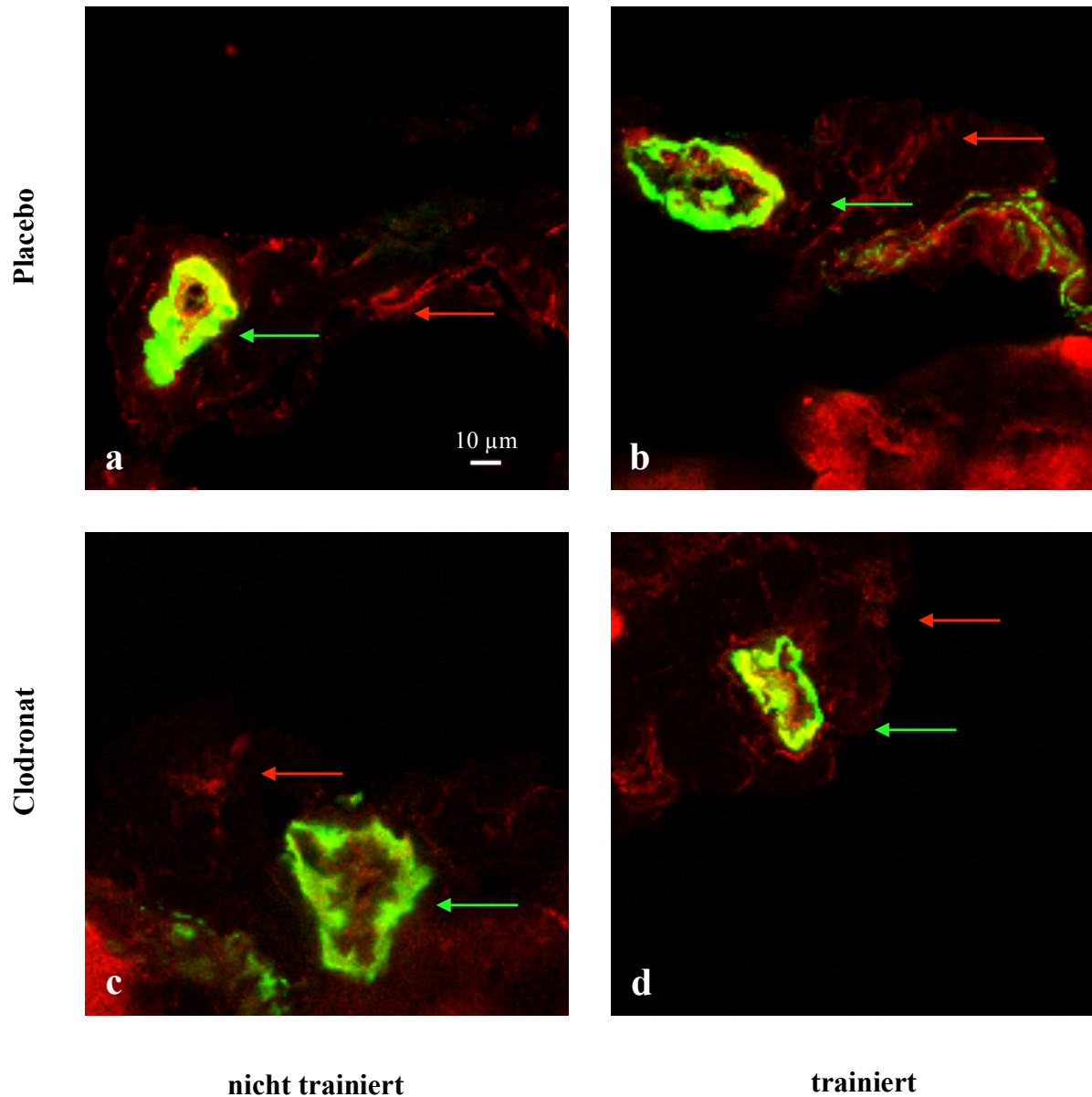


Abb. 22: Darstellung der perivaskulären Makrophagenflächen und glatten Muskelzellflächen der Gefäßwände

( $n=4-6$ )

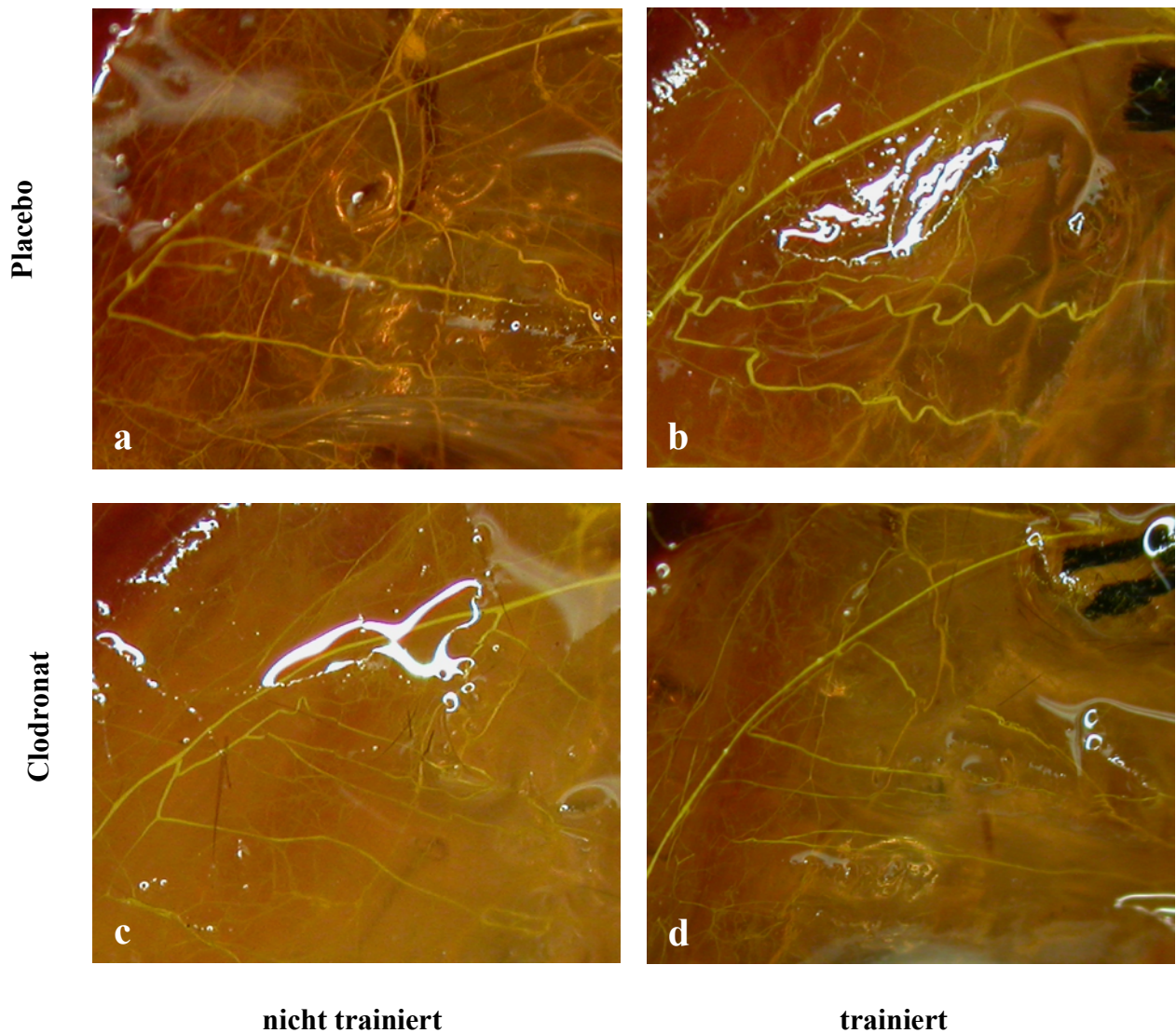
Die Dicke der Media der Kollateralarterien (grün in Abb. 23) als Parameter für die Proliferation der glatten Muskelzellen war bei ausdauertrainierten und mit Placebo behandelten Mäusen ebenfalls stärker ausgeprägt als bei nicht trainierten Mäusen mit Clodronat-Behandlung. Gemessen wurde dies anhand der relative Fläche der glatten Muskulatur der Arterienwand ( $\alpha$ -smooth muscle actin).



**Abb. 23: Konfokalmikroskopische Darstellung der Kollateralarterien (grüner Pfeil) mit perivaskulären Makrophagen (roter Pfeil) im Hinterlauf**



Durch Ausdauertraining entsprach die Wanddicke in der Placebo-Gruppe das  $2,0 \pm 0,2$ -fache ( $p = 0,029$ ) der nicht trainierten Tiere. Bei der Clodronat-Gruppe wurde in der nicht trainierten Gruppe ein Anteil von  $0,5 \pm 0,1$ , bzw. von  $0,8 \pm 0,1$  bei den trainierten Mäusen gemessen.



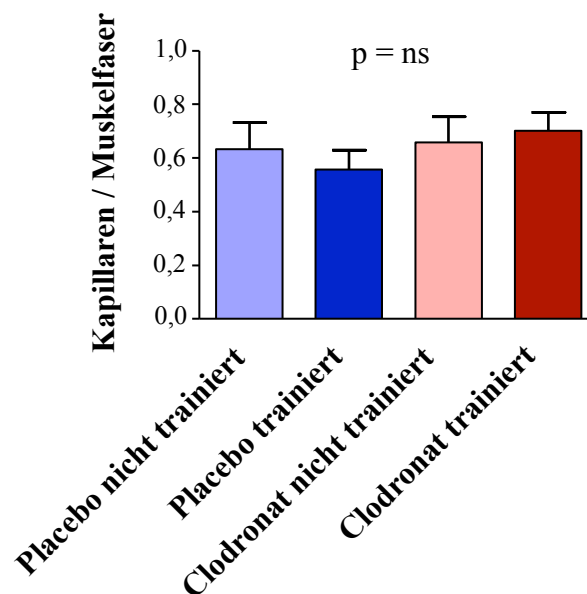
**Abb. 24: Microfil-Angiographie zur Darstellung der Kollateralarterien im rechten Hinterlauf**

*Dargestellt sind die Arterien des rechten Hinterlaufes sieben Tage nach Femoralarterienligatur. Man erkennt eine ausgeprägte Größenzunahme der Kollateralarterien mit charakteristischem korkenzieherartigen Aussehen bei den trainierten und mit Placebo behandelten Tieren (b), im Gegensatz zu den nicht trainierten und mit Clodronat behandelten Tieren (c).*

### 5.3.2 Arteriogenese versus Angiogenese

Neben einem Größenwachstum präexistenter Arterien sollte der Frage nachgegangen werden, ob es zusätzlich zu einem gesteigerten Wachstum von Kapillaren gekommen war.

Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden die Kapillaren mit Anti-CD31 angefärbt und pro Muskelfaser des M. adductor magnus ausgezählt und verglichen. Es stellte sich kein Unterschied in der Anzahl der Kapillaren dar, was gegen einen Unterschied in der Angiogenese zwischen allen vier Gruppen spricht.



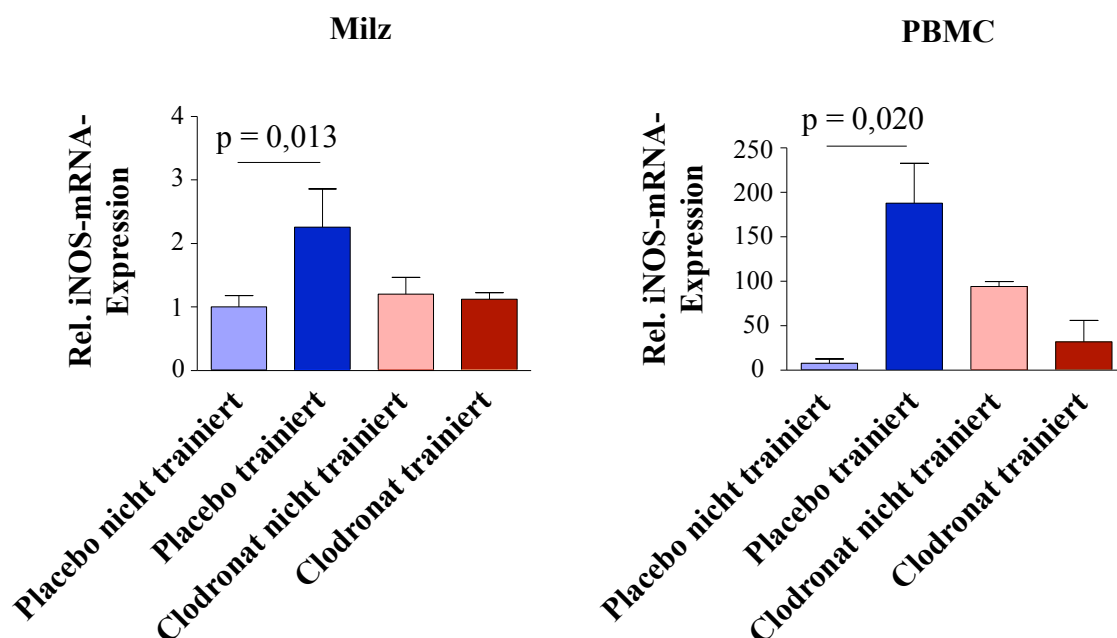
**Abb. 25:** Histologische Darstellung der Kapillaren pro Muskelfaser im M. adductor magnus ( $n=6-10$ )

## 5.4 Einfluss von Ausdauertraining und Clodronat auf den Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel

### 5.4.1 Ausdauertraining vor Femoralarterienligatur erhöht iNOS-Expression in mononukleären Zellen und Milz

Für die Beurteilung der iNOS-Expression wurde einerseits Milzgewebe untersucht, da die Milz als Teil des retikuloendothelialen Systems eine große Zahl an Monozyten aufwies und somit ein Effekt am ehesten nachzuweisen war. Andererseits wurden auch die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, *PBMC*) untersucht, um ebenfalls eine systemische Wirkung darstellen zu können.

Sieben Tage nach Femoralarterienligatur lässt sich eine stark erhöhte Expression von iNOS sowohl in den mononukleären Zellen als auch im Milzgewebe der mit Placebo behandelten und trainierten Mäuse erkennen. Dieser durch Ausdauertraining hervorgerufene Anstieg wird durch Clodronat vollständig inhibiert. Außerdem spiegeln die Ergebnisse eine systemische Reaktion auf das Ausdauertraining wider.



**Abb. 26: Relative iNOS-mRNA-Expression**

Dargestellt sind die jeweils relativen Expressionen der iNOS-mRNA im Milzgewebe (linkes Diagramm) und in den mononukleären Zellen des Blutes (PBMC; rechtes Diagramm). ( $n=4-6$ )



#### 5.4.2 Ausdauertraining erhöht die perivaskuläre Freisetzung von iNOS

Um zu untersuchen, ob die perivaskulär detektierten Makrophagen auch vermehrt iNOS freisetzen, wurde eine weitere immunhistochemische Färbung von iNOS durchgeführt. Man erkennt die proportional zur Makrophagenfläche ansteigende Aktivität der iNOS (dunkelblau). Hierbei wurde deutlich, dass die durch Ausdauertraining erhöhte quantitative Anzahl von Makrophagen auch eine qualitative Erhöhung der Aktivität bewirkt, nämlich der Expression von iNOS.

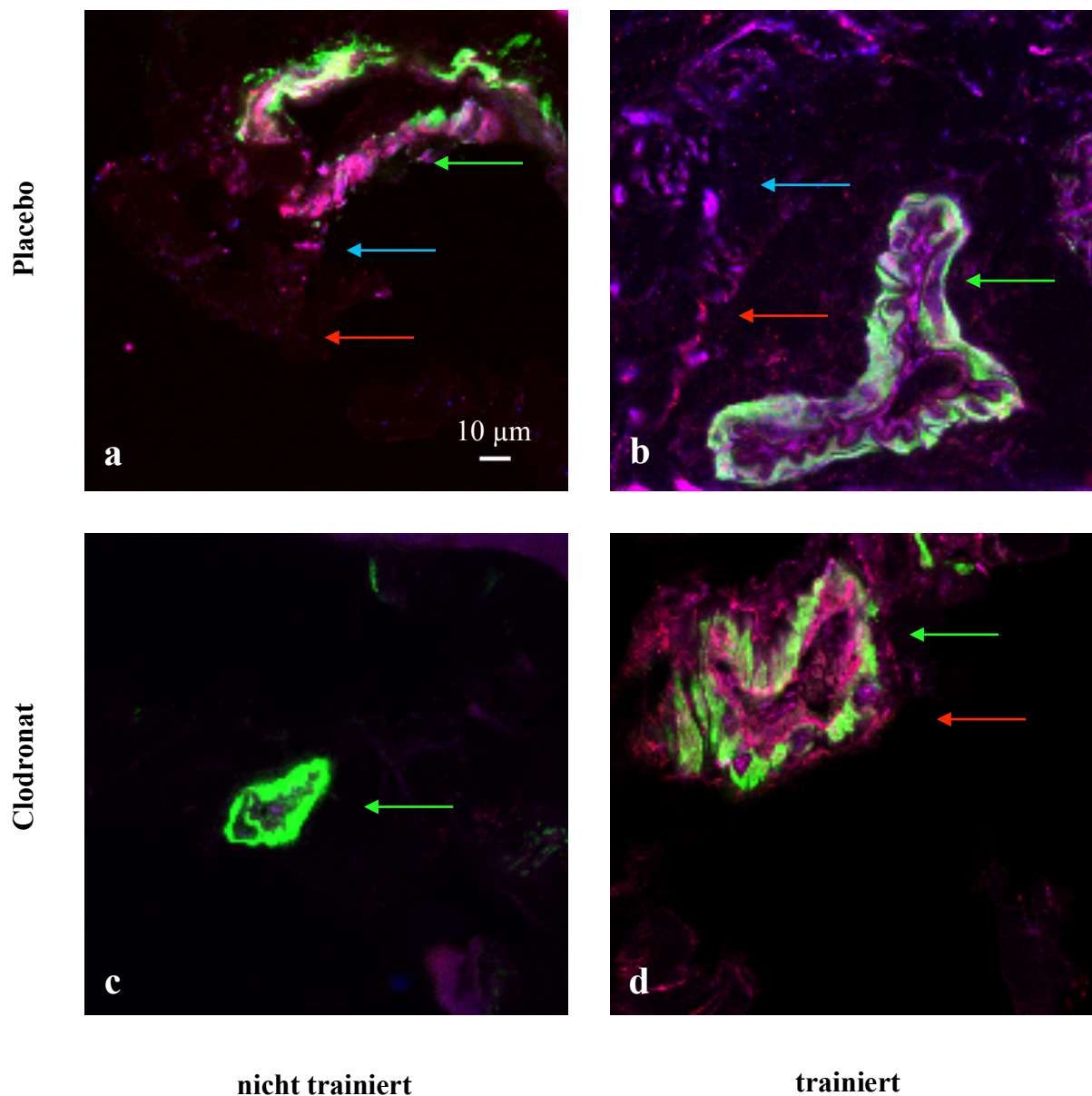
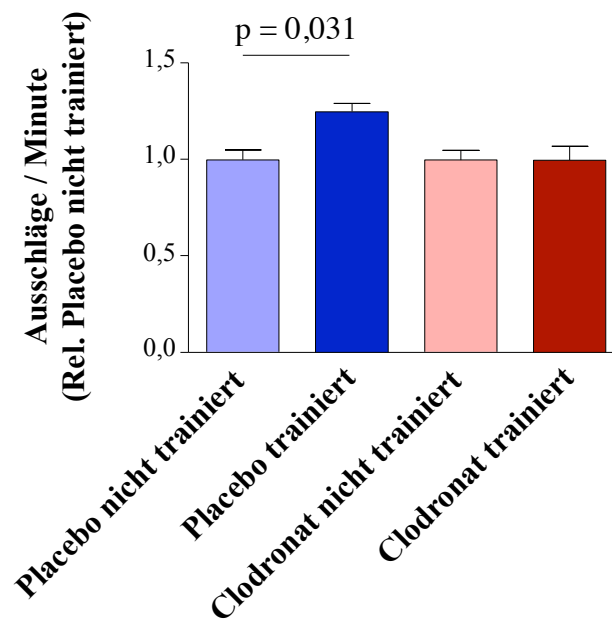


Abb. 27: Histologische Darstellung der Kollateralarterien (grüner Pfeil) mit perivaskulären Makrophagen (roter Pfeil) und dem darin befindlichen iNOS (blauer Pfeil)

### 5.4.3 NO-Quantifizierung im Adduktorengewebe

Die Menge an Stickstoffmonoxid im Adduktorenmuskel wurde mittels Arginin-Citrullin-Assay ermittelt. Ausgedrückt wurde die Bioverfügbarkeit des Stickstoffmonoxid relativ zur nicht trainierten Placebo-Gruppe. Nach Clodronat-Behandlung war die Bioverfügbarkeit von NO vermindert, wobei sie bei Placebo-Behandlung und zusätzlichem Ausdauertraining signifikant am größten war, nämlich 1,26-fach größer als die der Referenzgruppe ( $p = 0,031$ ).



**Abb. 28: Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid**  
( $n=6-8$ )

## 6 Diskussion

In dieser Studie konnten die präventiven Effekte von Ausdauertraining auf das Kollateralarterienwachstum nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese präventiven Effekte durch eine systemische Monozytendepletion stark gehemmt werden, was die wichtige Rolle von Monozyten in der Arteriogenese noch einmal unterstreicht. Erstmals konnte nun auch das von Monozyten gebildete iNOS als ein Schlüsselenzym bei der Kollateralarterienbildung identifiziert werden.

Um die Funktion der Monozyten untersuchen zu können, war eine vollständige, aber auch möglichst nebenwirkungsarme Depletion dieser Zellen von außerordentlicher Bedeutung. Da bis heute noch kein einheitliches Verfahren für eine langfristige Monozytendepletion etabliert war, ist ein entsprechendes Behandlungsschema in dieser Studie erarbeitet worden. Nachdem die optimale Clodronat-Dosierung (mit 100 µl i.v. alle vier Tage) herausgesucht worden war, konnte eine langanhaltende und effektive Monozytendepletion herbeigeführt werden. Durch die Reduktion der zirkulierenden Monozyten konnten diese nur vermindert in das perivaskuläre Muskelgewebe migrieren. Das für die Arteriogenese zwingend erforderliche inflammatorische Milieu war somit für diese Gruppe nicht mehr gewährleistet.

Die Reduktion der in das perivaskuläre Gewebe migrierten Makrophagen konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Nur in der trainierten und mit Placebo behandelten Gruppe kam es zu einem Anstieg der perivaskulären Makrophagen. Bei der nicht trainierten Gruppe war dieser Anstieg sehr viel geringer, was auf die verminderten laminaren Scherkräfte (*fluid shear stress*, FSS) zurückzuführen ist. Die durch die Femoralarterienligatur hervorgerufene Druckdifferenz proximal und distal der Stenose wird durch die erhöhte Durchblutung bei Ausdauertraining verstärkt. Somit wird durch Ausdauertraining auch der FSS – der adäquate Reiz für Kollateralarterienwachstum – gesteigert.

Bei den mit Clodronat behandelten Mäusen konnte eine geringere Dichte von perivaskulären Makrophagen nachgewiesen werden als bei den trainierten, mit Placebo behandelten Mäusen. Die Erklärung hierfür ist in der durch clodronatinduzierter Depletion geringen Anzahl an zirkulierenden Monozyten zu suchen. Es konnte folglich durch Mangel an Zellen nicht zu einer Migration in das Gewebe kommen.

Nachdem mikroskopisch eine Erhöhung der Makrophagendichte im M. adductor magnus gezeigt werden konnte, wurde die Aktivität dieser Zellen untersucht. In der Fragestellung ging es darum, ob es zu einer vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) kommen würde. Dieser Frage wurde sowohl histologisch als auch molekularbiologisch durch Genexpressionsanalyse nachgegangen. Mit beiden Methoden konnte eine deutlich erhöhte iNOS-Expression festgestellt werden, die in der Histologie eindeutig mit den Makrophagen kolokalisiert werden konnte.

Auch in der Milz war die Expression der iNOS durch Ausdauertraining angestiegen, was eine nicht nur lokal auf den ligierten Muskel begrenzte, sondern systemische Reaktion offenbarte.

Um nun auch die Aktivität der NO-Synthase nachweisen zu können, wurde im Adduktorengewebe die Bioverfügbarkeit von NO radioaktiv quantifiziert. Das Ergebnis war proportional zur Expression der iNOS.

Mit den Laser-Doppler-Perfusionsmessungen wurden die Auswirkungen von Ausdauertraining und Monozytendepletion auf die Hinterlaufperfusion gemessen. Hierbei konnten weder Unterschiede vor noch unmittelbar nach Femoralarterienligatur festgestellt werden. Eine strukturelle Veränderung der Arterien alleine durch das Ausdauertraining hat demnach nicht stattgefunden. Bei den Messungen nach drei und sieben Tagen konnten sehr deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die mit Placebo behandelte und trainierte Gruppe konnte eine beschleunigte Perfusionswiederherstellung des ligierten Beines vorweisen. Bei den anderen drei Gruppen war dies nicht der Fall. Nur die Gruppe, die sowohl trainiert als auch „Monozyten-kompetent“ war, konnte ein beschleunigtes Kollateralarterienwachstum aufweisen. Bei den anderen Gruppen fehlten entweder Training (mit Placebo behandelt und nicht trainiert), Monozyten (mit Clodronat behandelt und trainiert) oder beides (mit Clodronat behandelt und nicht trainiert).

Diese Erkenntnisse zeigen deutlich das Zusammenspiel von Ausdauertraining und zirkulierenden Monozyten und deren gemeinsame Relevanz für die Arteriogenese. Besonders ist hierbei, dass es sich um präventives Ausdauertraining handelt, das mononukleäre Zellen aktiviert und bei einem nachfolgenden Gefäßverschluss rekrutiert.

Ein positiver Einfluss von Monozyten auf die Arteriogenese ist bereits anerkannt<sup>1, 64</sup>. Um die Kausalität der Monozyten für die Arteriogenese aufzuzeigen, sind Studien an *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) defizienten Mäusen<sup>3</sup> und an mit 5-Fluoruracil (5-FU), einem starken zytostatischen Antimetaboliten, behandelten Mäusen durchgeführt worden<sup>31</sup>.

5-FU bewirkte u.a. eine Monozytendepletion, die das Kollateralarterienwachstum inhibierte, wobei es im Anschluss an die Depletion zu einem starken Reboundphänomen kam. Die anschließende Re-Injektion isolierter Monozyten beschleunigte die Perfusionswiederherstellung deutlich<sup>31</sup>. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte in diesen Studien nicht eindeutig geklärt werden.

Der Nachteil dieser Methoden war, dass keine isolierte Monozytendepletion sichergestellt werden konnte. Es kam zusätzlich zu unspezifischem Zelluntergang mit antiproliferativen Wirkungen. Bei der clodronatinduzierten Monozytendepletion werden selektiv Monozyten und Makrophagen depletiert<sup>20</sup>, da die Apoptose dieser Zellen erst nach Phagozytose der Liposomen eintritt<sup>81</sup>.

Obwohl bei der Arteriogenese proinflammatorische Botenstoffe eine wesentliche Rolle spielen, konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Interferon (IFN)- $\beta$ , einem ebenfalls proinflammatorischen Zytokin, das Kollateralarterienwachstum inhibiert<sup>63</sup>. Ein antiinflammatorischer Prozess, der großen Einfluss auf das Kollateralarterienwachstum hat, ist Ausdauertraining. Tierexperimentell konnte an Ratten gezeigt werden, dass es nach akuter Femoralarterienligatur mit vorherigem Ausdauertraining zu einem erhöhten Blutfluss in den Hinterläufen der trainierten Tiere im Vergleich zu den nicht trainierten Tieren kam<sup>92</sup>. Diese Tatsache beruhte allerdings eher auf einer endothelvermittelten Vasodilatation während der Perfusionsmessung als auf dem Wachstum von Kollateralarterien. In der vorliegenden Studie wurde die Perfusion einerseits endothelunabhängig unter maximaler Vasodilatation mittels Mikrosphärenperfusion ermittelt, andererseits wurde zusätzlich zur Laser-Doppler-Messung histologisch die Fläche der glatten Muskelzellen der Kollateralarterien gemessen. Das Ergebnis zeigt eindeutig eine verbesserte Perfusion, die nicht nur auf einer vasomotorischen Reaktion, sondern auf einer Größenzunahme der Kollateralarterien beruht.

Ein wesentlicher Mechanismus ist hierbei die Erhöhung des FSS, der durch einen Druckgradienten von proximal nach distal über der Gefäßstenose ausgelöst wird<sup>36</sup>. Dieser FSS führt zur Aktivierung des Endothels und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in Konduktanzarterien<sup>15</sup>. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der iNOS auf die Arteriogenese untersucht. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass iNOS von zirkulierenden mononukleären Zellen produziert wird, da die clodronatinduzierte Monozyten- und Makrophagendepletion eine trainingsinduzierte Arteriogenese inhibiert. Die iNOS konnte sowohl in den zirkulierenden mononukleären Zellen als auch im perivaskulären Gewebe des Hinterlaufs hochreguliert nachgewiesen werden. Im Rahmen der Leukodiapedese von

Monozyten aus den Kollateralarterien in das perivaskuläre Kompartiment, transportieren diese die iNOS intrazellulär mit sich, die dann perivaskulär weiter freigesetzt wird. Ein Abfall der Blutmonozytenkonzentration unmittelbar nach Gefäßokklusion konnte auch in anderen Studien gezeigt werden und steht in Einklang mit einer Umverteilung der zirkulierenden Monozyten im Sinne einer Rekrutierung<sup>30</sup>. Die Theorie, den Ursprung der iNOS in mononukleären Zellen zu suchen, wird in einem Knochenmark-Transplantationsexperiment weiter bestätigt. Bei iNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte keine verbesserte Perfusionswiederherstellung durch Ausdauertraining beobachtet werden. Erst als Knochenmark von Wildtyp-Mäusen in die iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse transplantiert worden war, konnte ein typischer trainingsinduzierter Perfusionsanstieg erfasst werden<sup>65</sup>.

Das Kollateralarterienwachstum wird somit nicht nur endothelgesteuert durch FSS initiiert, sondern auch durch die perivaskuläre Freisetzung von iNOS durch Monozyten bzw. Makrophagen. Dies wird funktionell unterstrichen durch den positiven Effekt präventiven Trainings *vor* Ligatur der Femoralarterie.

## **Ausblick**

Körperliche Bewegung stellt bis heute eines der wichtigsten Therapieoptionen bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) dar. Es hat sich herausgestellt, dass die schmerzfreie Laufristanz bei Patienten mit Claudicatio intermittens nach sechsmonatigem beaufsichtigten Gehtraining sogar einer Stent-Implantation überlegen war<sup>51</sup>. Gehtraining erhält daher als einzige Maßnahme zur Behandlung der Claudicatio intermittens bei der pAVK eine Klasse-IA-Empfehlung laut aktuellen ESC-Leitlinien<sup>77</sup>.

Die Tatsache, dass Ausdauertraining nicht nur als Therapeutikum bei bereits manifester pAVK, sondern auch als Prävention in gesunden Individuen positive Wirkungen nach Gefäßstenose auf das Kollateralarterienwachstum zeigt, ist eine wertvolle Erkenntnis für weitere Therapieempfehlungen<sup>24</sup>.

Körperliche Bewegung ist demnach ein wichtiger Bestandteil bei der Behandlung von pAVK-Patienten. Da die pAVK eine systemische Erkrankung ist, muss davon ausgegangen werden, dass nicht nur ein Gefäß, sondern mehrere arterielle Strombahnen von der progredienten stenosierenden Krankheit betroffen sind. Ausdauertraining wird nach einem diagnostizierten Gefäßverschluss nicht nur diesem durch angeregte Arteriogenese begegnen, sondern auch

zirkulierende mononukleäre Zellen aktivieren, die bei einer zu erwartenden zusätzlichen Gefäßokklusion rekrutiert werden können.

Die beschriebenen Ergebnisse sind möglicherweise nicht nur auf den Hinterlauf beschränkt, sondern können auch auf andere Strombahnen, wie z.B. die koronare Zirkulation, ausgeweitet werden. Es gibt bereits klinische Erfahrungen zu ausdauertrainingsassoziierten Veränderungen des koronaren Blutflusses<sup>93</sup>. In einer Studie wurden sowohl Probanden mit gesunden Koronararterien als auch Patienten mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen der Koronararterien im Sinne einer KHK einem dreimonatigen Ausdauertraining unterzogen. Hierbei zeigte sich nach Ablauf der Untersuchung ein verbesserter *Collateral Flow Index* (CFI) als Zeichen eines verbesserten Kollateralarterienwachstums in der trainierten Gruppe, nicht aber in der nicht trainierten Kontrollgruppe. Zudem war nur bei den trainierten Probanden eine Vergrößerung des koronararteriellen Gefäßdurchmessers festzustellen. Auch in dieser Studie bestätigte sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Training auf die Arteriogenese<sup>94</sup>.

Auch die Erkenntnis, dass Monozyten den proarteriogenen Faktor iNOS produzieren, könnte den Weg für neue Therapieansätze bahnen. Tierexperimentelle Ansätze, in denen Monozyten ex vivo modifiziert und re-transplantiert werden, um verstärkt ein lokales proarteriogenes Milieu zu erzeugen, zeigten erste Erfolge<sup>19, 33, 40</sup>. Zum einen wurden stimulierte Monozyten intravenös re-infundiert<sup>33</sup>, in einer anderen Studie wurden die Makrophagen intramuskulär injiziert<sup>40</sup>. So könnte auch die Freisetzung von iNOS aus Monozyten zur richtigen Zeit, nämlich unmittelbar nach Gefäßokklusion, und am richtigen Ort, nämlich lokal in den präexistenten Kollateralarterien, einen potentiellen zukünftigen Angriffspunkt neuer Therapiemöglichkeiten darstellen.

Bislang haben Versuche, sich die proarteriogene Wirkung von Wachstumsfaktoren zu Nutze zu machen, keinen Einzug in die Klinik gefunden<sup>64</sup>. Die intraarterielle Gabe von TGF- $\beta$ 1<sup>27</sup>, sowie die intrakoronare Applikation von rekombinantem FGF-2<sup>73</sup> führte zu keiner verbesserten Kollateralarterienbildung. Auch in der START-Studie konnte nach Applikation von GM-CSF keine Verbesserung der Gehstrecke bewirkt werden<sup>84</sup>. Eine lokale Behandlung von Apolipoprotein-E-Knock-Out-Mäusen mit MCP-1 führte zwar zu einer gesteigerten Kollateralisierung, allerdings auch zu einer Instabilität von atherosklerotischen Plaques und deren Ruptur<sup>83</sup>. Diese unerwünschten Nebenwirkungen zeigten die Notwendigkeit einer zielgerichteten und möglichst spezifischen Therapie, da insbesondere Monozyten weitreichende Funktionen auch in der Atherogenese darstellen.

Bei der Translation von tierexperimentellen Ergebnissen hin zur Anwendung beim Menschen sind zudem die relevanten Größenunterschiede zu beachten. Bei der Maus werden nur wenige Zellzyklen benötigt, um aus einer präexisten Kollateralarterie von 20-40  $\mu\text{m}$  Durchmesser eine neue Konduktanzarterie von 100  $\mu\text{m}$  entstehen zu lassen. Beim Menschen wäre eine größere Anzahl von Zellzyklen erforderlich und zudem eine Degradation des umliegenden Gewebes, um Platz für eine voll ausgereifte Kollateralarterie zu schaffen<sup>64</sup>.

Bis potentielle pharmakologische Therapieansätze Einzug in die Klinik erhalten werden, wird man den betroffenen Patienten sowohl präventiv als auch zur Therapie der pAVK weiterhin zunächst nur körperliche Bewegung verschreiben können.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest.* 101:40-50
2. Belardinelli R, Paolini I, Cianci G, Piva R, Georgiou D, Purcaro A (2001) Exercise training intervention after coronary angioplasty: The etica trial. *J Am Coll Cardiol.* 37:1891-1900
3. Bergmann CE, Hoefer IE, Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR (2006) Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol.* 80:59-65
4. Bian K, Doursout MF, Murad F (2008) Vascular system: Role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 10:304-310
5. Bondke A, Buschmann IR, Bode C, Buschmann EE (2007) [inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle]. *Hamostaseologie.* 27:363-372
6. Buschmann IR, Hoefer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W (2001) Gm-csf: A strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* 159:343-356
7. Cai W, Vosschulte R, Afsah-Hedjri A, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J (2000) Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 32:997-1011
8. Cai W, Schaper W (2008) Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 40:681-692
9. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6:389-395
10. Chandraratne S, von Bruehl ML, Pagel JJ, Stark K, Kleinert E, Konrad I, Farschtschi S, Coletti R, Gartner F, Chillo O, Legate KR, Lorenz M, Rutkowski S, Caballero-Martinez A, Starke R, Tirniceriu A, Pauleikhoff L, Fischer S, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Ware J, Nieswandt B, Schaper W, Schulz C, Deindl E, Massberg S (2015) Critical role of platelet glycoprotein ibalpha in arterial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35:589-597
11. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T (2007) Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res.* 100:904-913

12. Chomistek AK, Manson JE, Stefanick ML, Lu B, Sands-Lincoln M, Going SB, Garcia L, Allison MA, Sims ST, LaMonte MJ, Johnson KC, Eaton CB (2013) Relationship of sedentary behavior and physical activity to incident cardiovascular disease: Results from the women's health initiative. *J Am Coll Cardiol.* 61:2346-2354
13. Crottogini A, Meckert PC, Vera Janavel G, Lascano E, Negroni J, Del Valle H, Dulbecco E, Werba P, Cuniberti L, Martinez V, De Lorenzi A, Telayna J, Mele A, Fernandez JL, Marangunich L, Criscuolo M, Capogrossi MC, Laguens R (2003) Arteriogenesis induced by intramyocardial vascular endothelial growth factor 165 gene transfer in chronically ischemic pigs. *Hum Gene Ther.* 14:1307-1318
14. Degen A, Millenaar D, Schirmer SH (2013) Therapeutic approaches in coronary collateral circulation. *Curr Cardiol Rev.*
15. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399:601-605
16. Dopheide JF, Scheer M, Doppler C, Obst V, Stein P, Vosseler M, Abegunewardene N, Gori T, Munzel T, Daiber A, Radsak MP, Espinola-Klein C (2015) Change of walking distance in intermittent claudication: Impact on inflammation, oxidative stress and mononuclear cells: A pilot study. *Clin Res Cardiol.*
17. Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, Schaper W (2006) The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 99:656-662
18. Faber JE, Chilian WM, Deindl E, van Royen N, Simons M (2014) A brief etymology of the collateral circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:1854-1859
19. Francke A, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC, Herold J (2013) Transplantation of bone marrow derived monocytes: A novel approach for augmentation of arteriogenesis in a murine model of femoral artery ligation. *Am J Transl Res.* 5:155-169
20. Fraser CC, Chen BP, Webb S, van Rooijen N, Kraal G (1995) Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after cl2mdp-liposome-mediated macrophage depletion. *Blood.* 86:183-192
21. Fulton WF (1964) Anastomotic enlargement and ischaemic myocardial damage. *Br Heart J.* 26:1-15
22. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376
23. Furchgott RF (1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: The basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovin: Retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM, ed. *Mechanisms of Vasodilatation, Vol. IV, New York. Raven Press.*
24. Gloekler S, Seiler C (2007) Cardiology patient page. Natural bypasses can save lives. *Circulation.* 116:e340-341

25. Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 57:707-736
26. Grimshaw MJ, Balkwill FR (2001) Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation--a potential mechanism. *Eur J Immunol.* 31:480-489
27. Grundmann S, van Royen N, Pasterkamp G, Gonzalez N, Tijsma EJ, Piek JJ, Hoefer IE (2007) A new intra-arterial delivery platform for pro-arteriogenic compounds to stimulate collateral artery growth via transforming growth factor-beta1 release. *J Am Coll Cardiol.* 50:351-358
28. Grundmann S, Schirmer SH, Hekking LH, Post JA, Ionita MG, de Groot D, van Royen N, van den Berg B, Vink H, Moser M, Bode C, de Kleijn D, Pasterkamp G, Piek JJ, Hoefer IE (2009) Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in growing collateral arteries and modulate leucocyte adhesion in arteriogenesis. *J Cell Mol Med.* 13:3463-3474
29. Hakim AA, Petrovitch H, Burchfiel CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD (1998) Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *N Engl J Med.* 338:94-99
30. Haverslag R, de Groot D, van den Borne P, Pasterkamp G, Hoefer IE (2011) Arterial occlusion induces systemic changes in leucocyte composition. *Eur J Clin Invest.* 41:943-950
31. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W (2002) Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H2411-2419
32. Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W (2006) Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 10:45-55
33. Herold J, Francke A, Weinert S, Schmeisser A, Hebel K, Schraven B, Roehl FW, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC (2014) Tetanus toxoid-pulsed monocyte vaccination for augmentation of collateral vessel growth. *J Am Heart Assoc.* 3:e000611
34. Hoefer IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W (2001) Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 49:609-617
35. Hoefer IE, Grundmann S, Schirmer S, van Royen N, Meder B, Bode C, Piek JJ, Buschmann IR (2005) Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. *J Am Coll Cardiol.* 46:994-1001
36. Hoefer IE, den Adel B, Daemen MJ (2013) Biomechanical factors as triggers of vascular growth. *Cardiovasc Res.* 99:276-283
37. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G (1988) Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 246:218-226

38. Ignarro LJ, Napoli C (2005) Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Diab Rep.* 5:17-23
39. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 273:H1255-1265
40. Jetten N, Donners MM, Wagenaar A, Cleutjens JP, van Rooijen N, de Winther MP, Post MJ (2013) Local delivery of polarized macrophages improves reperfusion recovery in a mouse hind limb ischemia model. *PLoS One.* 8:e68811
41. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 3:23-35
42. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 113:147-156
43. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 109:220-226
44. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: A report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation.* 119:480-486
45. Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS (2002) Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med.* 347:716-725
46. Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haperen R, Kostin S, Heil M, de Crom R, Schaper W (2007) Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1926-1933
47. Meier P, Hemingway H, Lansky AJ, Knapp G, Pitt B, Seiler C (2012) The impact of the coronary collateral circulation on mortality: A meta-analysis. *Eur Heart J.* 33:614-621
48. Meier P, Schirmer SH, Lansky AJ, Timmis A, Pitt B, Seiler C (2013) The collateral circulation of the heart. *BMC Med.* 11:143
49. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142

50. Morris SM, Jr., Billiar TR (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 266:E829-839
51. Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, Mohler ER, Cohen DJ, Reynolds MR, Massaro JM, Lewis BA, Cerezo J, Oldenburg NC, Thum CC, Goldberg S, Jaff MR, Steffes MW, Comerota AJ, Ehrman J, Treat-Jacobson D, Walsh ME, Collins T, Badenhop DT, Bronas U, Hirsch AT (2012) Supervised exercise versus primary stenting for claudication resulting from aortoiliac peripheral artery disease: Six-month outcomes from the claudication: Exercise versus endoluminal revascularization (clever) study. *Circulation.* 125:130-139
52. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro LJ (2013) Effects of nitric oxide on cell proliferation: Novel insights. *J Am Coll Cardiol.* 62:89-95
53. Niebauer J, Cooke JP (1996) Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol.* 28:1652-1660
54. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-526
55. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T (2004) Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1664-1668
56. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG (2007) The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 454:345-359
57. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386:671-674
58. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 4:3-24
59. Roth DM, White FC, Nichols ML, Dobbs SL, Longhurst JC, Bloor CM (1990) Effect of long-term exercise on regional myocardial function and coronary collateral development after gradual coronary artery occlusion in pigs. *Circulation.* 82:1778-1789
60. Sattelmair J, Pertman J, Ding EL, Kohl HW, 3rd, Haskell W, Lee IM (2011) Dose response between physical activity and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Circulation.* 124:789-795
61. Schaper J, Konig R, Franz D, Schaper W (1976) The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined sem and tem study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 370:193-205
62. Schaper W (2009) Collateral circulation: Past and present. *Basic Res Cardiol.* 104:5-21

63. Schirmer SH, Fledderus JO, Bot PT, Moerland PD, Hoefer IE, Baan J, Jr., Henriques JP, van der Schaaf RJ, Vis MM, Horrevoets AJ, Piek JJ, van Royen N (2008) Interferon-beta signaling is enhanced in patients with insufficient coronary collateral artery development and inhibits arteriogenesis in mice. *Circ Res.* 102:1286-1294
64. Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N (2009) Stimulation of collateral artery growth: Travelling further down the road to clinical application. *Heart.* 95:191-197
65. Schirmer SH, Schuh L, Böhm M, Laufs U (2011) Physical exercise prior to femoral artery ligation stimulates collateral artery growth in an nitric oxide-dependent manner. *European Heart Journal.* Suppl 32, P440
66. Schnohr P, O'Keefe JH, Marott JL, Lange P, Jensen GB (2015) Dose of jogging and long-term mortality: The copenhagen city heart study. *J Am Coll Cardiol.* 65:411-419
67. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 436:257-270
68. Schuler G, Adams V, Goto Y (2013) Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: Results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J.* 34:1790-1799
69. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B (2001) Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation.* 104:2012-2017
70. Seiler C (2003) The human coronary collateral circulation. *Heart.* 89:1352-1357
71. Seiler C, Engler R, Berner L, Stoller M, Meier P, Steck H, Traupe T (2013) Prognostic relevance of coronary collateral function: Confounded or causal relationship? *Heart.* 99:1408-1414
72. Shyy JY, Chien S (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 9:707-713
73. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA (2002) Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: Double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation.* 105:788-793
74. Snyder SH (1995) Nitric oxide. No endothelial no. *Nature.* 377:196-197
75. Statistisches Bundesamt (2012) Todesursachen in deutschland.
76. Stevenson JA, Feleki V, Rechnitzer P, Beaton JR (1964) Effect of exercise on coronary tree size in the rat. *Circ Res.* 15:265-269
77. Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clement D, Collet JP, Cremonesi A, De Carlo M, Erbel R, Fowkes FG, Heras M, Kownator S, Minar E, Ostergren J, Poldermans D, Rimbaut V, Roffi M, Rother J, Sievert H, van Sambeek

- M, Zeller T (2011) Esc guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: The task force on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases of the european society of cardiology (esc). *Eur Heart J*. 32:2851-2906
78. van Rooijen N, Kors N, ter Hart H, Claassen E (1988) In vitro and in vivo elimination of macrophage tumor cells using liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 54:241-245
  79. van Rooijen N, Sanders A (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: Mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*. 174:83-93
  80. van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK (1996) Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods*. 193:93-99
  81. van Rooijen N, Sanders A (1997) Elimination, blocking, and activation of macrophages: Three of a kind? *J Leukoc Biol*. 62:702-709
  82. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*. 49:543-553
  83. van Royen N, Hoefer I, Bottinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Buschmann I, Piek JJ (2003) Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein e-deficient mice but induces systemic monocytic cd11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res*. 92:218-225
  84. van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CY, Ubbink D, Buschmann EE, Voskuil M, Bot P, Hoefer I, Schlingemann RO, Biemond BJ, Tijssen JG, Bode C, Schaper W, Oskam J, Legemate DA, Piek JJ, Buschmann I (2005) Start trial: A pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. 112:1040-1046
  85. Vries MH, Wagenaar A, Verbruggen SE, Molin DG, Post MJ (2015) Cxcl1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenesis*. 18:163-171
  86. Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, Rumley A, Walker M, Lennon L (2002) Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation*. 105:1785-1790
  87. World Health Organization (2010) Global status report on noncommunicable diseases.
  88. World Health Organization (2011) Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.
  89. World Health Organization (2013) World health statistics.

90. Wustmann K, Zbinden S, Windecker S, Meier B, Seiler C (2003) Is there functional collateral flow during vascular occlusion in angiographically normal coronary arteries? *Circulation*. 107:2213-2220
91. Yang BL, Wu S, Wu X, Li MB, Zhu W, Guan Y, Liu LH, Luo MY, Cai WJ, Schaper J, Schaper W (2013) Effect of shunting of collateral flow into the venous system on arteriogenesis and angiogenesis in rabbit hind limb. *Acta Histochem Cytochem*. 46:1-10
92. Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL (2000) Prior exercise training increases collateral-dependent blood flow in rats after acute femoral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279:H1890-1897
93. Zbinden R, Zbinden S, Windecker S, Meier B, Seiler C (2004) Direct demonstration of coronary collateral growth by physical endurance exercise in a healthy marathon runner. *Heart*. 90:1350-1351
94. Zbinden R, Zbinden S, Meier P, Hutter D, Billinger M, Wahl A, Schmid JP, Windecker S, Meier B, Seiler C (2007) Coronary collateral flow in response to endurance exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 14:250-257



## 8 Publikationen

Während der Anfertigung der vorgelegten Dissertation sind folgende Publikationen und Abstracts entstanden:

### **Publikationen**

Schirmer SH, **Millenaar DN**, Werner CM, Schuh L, Degen A, Bettink S, Lipp P, van Rooijen N, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2015) Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide. *ATVB 2015 in press*

Degen A, **Millenaar DN**, Schirmer SH (2013) Therapeutic Approaches In Coronary Collateral Circulation. *Curr Cardiol Rev. 2013 May 30*

### **Abstracts**

**Millenaar DN**, Bettink S, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH (2015) Monozytenfunktion in der trainingsinduzierten Arteriogenese. *Clin Res Cardiol 104, Suppl 1, P432, April 2014. 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie; DOI 10.1007/s00392-015-1100-4*

Schirmer SH, **Millenaar DN**, Schuh L, Degen A, Böhm M, Laufs U (2014) Exercise promotes post-ischemic collateral artery growth mediated by inducible nitric oxide expression of monocytes. *European Heart Journal (2014) 35 (Abstract Supplement), 377*

**Millenaar DN**, Degen A, Bettink S, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH (2014) Makrophagendepletion durch Clodronat-Liposomen inhibiert trainingsinduziertes Kollateralarterienwachstum. *Clin Res Cardiol 103, Suppl 1, P764, April 2014. 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie; DOI 10.1007/s00392-014-1100-9*

**Millenaar DN**, Degen A, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH (2013) Macrophage depletion using clodronate liposomes delays exercise-induced collateral artery growth. *European Heart Journal (2013) 34 (Abstract Supplement), P604, 116*

## **9 Dank**

Die Danksagung ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

## **10 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.